

**ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG
VON PHOSPHOFRUKTOKINASE
AUS DUNALIELLA SALINA**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereichs Biologie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Wolfgang Vettermann
aus Herne

1976

ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG
VON PHOSPHOFRUKTOKINASE
AUS DUNALIELLA SALINA

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereichs Biologie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
WOLFGANG VETTERMANN
aus Herne

1. Referent: Prof. Dr. Dr. H. H. Paradies

2. Referent: Prof. Dr. H.-J. Risse

Tag der letzten Prüfung: 8.10. 1976



Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pflanzenphysiologie und Zellbiologie der Freien Universität Berlin unter Anleitung von Herrn Prof. H.H. Paradies angefertigt, dem ich für Anregungen und Diskussionen danke.

Herzlicher Dank sei auch denen ausgesprochen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
EINLEITUNG	1
1. Erste Ansätze zur Isolierung aktiver Phosphofruktokinase	2
2. Lokalisation der Phosphofruktokinase in der Zelle	2
3. Verhalten homogener Phosphofruktokinase bei der analytischen Ultrazentrifugation	2
4. Molekulargewichte nativer und dissoziierter Phosphofruktokinase aus Eukaryonten	3
5. Molekulargewichte nativer und dissoziierter Phosphofruktokinase aus Prokaryonten	4
6. Vergleich zwischen Pro- und Eukaryonten Phosphofruktokinase	5
7. Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Phosphofruktokinase	5
8. Phosphofruktokinase Isoenzyme	5
9. Reaktionsmechanismus der Phosphofruktokinase	6
10. Allosterischer Charakter der Phosphofruktokinase	6
11. Bedeutung der regulatorischen Eigenschaften der Phosphofruktokinase für die Glykolyse	7
12. Problemstellung	8
 MATERIAL UND METHODEN	
1. Zellmaterial	9
2. Zellkultur	9
3. Aufarbeitung	10
1. Isolation von Dunaliella Phosphofruktokinase	11
2. Reinigung der Dunaliella Phosphofruktokinase	11
4. Nachweis der Phosphofruktokinase Aktivität	12

	Seite
5. Molekulargewichtsbestimmungen	13
1. Säulenchromatographie	13
2. Präparative und analytische Gelelektrophorese	14
3. Ultrazentrifugation	16
Proteinbestimmung	17
Chemikalien	17

ERGEBNISSE

1.1. Verhalten der Dunaliella Phosphofruktokinase bei der Reinigung	18
1.2 Gelelektrophoretische Analyse der Fraktionen nach der Agarose A 1.5m Chromatographie	23
1.3. Physikalisch chemische Parameter der Dunaliella Phosphofruktokinase	23
1. Spektroskopische Messungen	23
2. Elektrophoretisches Verhalten der Dunaliella Phosphofruktokinase	26
3. Bandensedimentation im linearen Saccharosegradienten	26
4. Verhalten der Dunaliella Phosphofruktokinase in der analytischen Ultrazentrifuge	26
5. Theoretische Aspekte zur Molekulargewichtsbestimmung in der analytischen Ultrazentrifuge	30
6. Darstellung der Untereinheiten der Dunaliella Phosphofruktokinase	35
7. Zusammenfassung der physikalisch chemischen Parameter der Dunaliella Phosphofruktokinase	36
1.4. Molekulare Parameter der Dunaliella Phosphofruktokinase	39
1. Stokes'scher Radius	39
2. Berechnung der theoretischen Sedimentationskonstante	41

	Seite
3. Berechnung des theoretischen Diffusionskoeffizienten	43
4. Berechnung des durchschnittlichen Streumassenradius	44
5. Berechnung der Achsenverhältnisse	44
2.1. Kinetik der Dunaliella salina Phosphofruktokinase	45
1. pH Abhängigkeit	47
2. Temperaturabhängigkeit	49
2.2. Bestimmung der Michaelis Konstanten	49
2.3. Untersuchungen zur Aufklärung des Dunaliella Phosphofruktokinase Reaktionsmechanismus	53
2.4. Endprodukthemmung	53
2.5. Austauschbarkeit von Nukleotidtriphosphaten an Dunaliella Phosphofruktokinase	65
2.6. Effektoren der Dunaliella Phosphofruktokinase	65
1. Einfluß von Mg^{2+} Ionen auf die Reaktionsgeschwindigkeit	65
2. Einfluß von Citrat auf die Reaktionsgeschwindigkeit	68
3. Phosphoenolpyruvat als Effektor	68
2.7. Hinweise auf das allosterische Verhalten der Dunaliella Phosphofruktokinase	68
DISKUSSION	73
ZUSAMMENFASSUNG	80
ABKÜRZUNGEN	82
LITERATURVERZEICHNIS	83

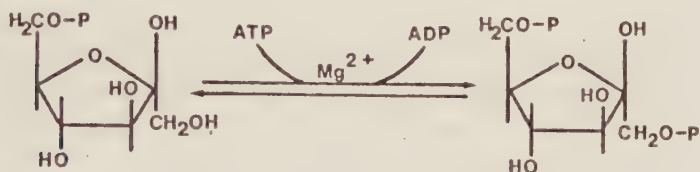


Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549013_0064

EINLEITUNG

Phosphofruktokinase (ATP-D-Fruktose-6-phosphat-1-phosphotransferase, E.C. 2.7.1.11) im folgenden Text PFK abgekürzt, katalysiert die Phosphorylierung von Fruktose-1.6-bisphosphat aus Fruktose-6-phosphat und ATP.



Diese Reaktion ist von DISCHE (1935) erstmalig beschrieben worden.

Die Bedeutung dieses Enzyms für die Regulation der Glykolyse wurde von CORI 1942 in seiner grundlegenden Arbeit über die Muskelkontraktion ausgesprochen.

Die Anreicherung von Hexosemonophosphaten unter bestimmten experimentellen Bedingungen ohne Steigerung der Milchsäurekonzentration führte zu der Schlußfolgerung, daß PFK als Schrittmacherenzym der Glykolyse anzusehen ist d.h., kohlenhydrathaltige Reservestoffe werden schneller zu Hexosemonophosphaten umgesetzt als Hexosemonophosphat zu Milchsäure.

Die Idee, PFK als Schlüsselenzym der Glykolyse zu betrachten, wurde von vielen Arbeitsgruppen im Hinblick auf eine Aufklärung des Pasteur Effekts übernommen. ENGELHARDT und SAKOV (1943) vermuteten, daß die Empfindlichkeit der PFK gegenüber oxidierenden Reagentien die Aktivität dieses Enzyms beeinflußt. Da zu diesem Zeitpunkt eine Isolierung des Enzyms noch nicht erfolgt war, wurden erste Aktivitätsmessungen aufgrund der Metabolitenkonzentration im Fließgleichgewicht durchgeführt (LYNEN et al. 1959, NEWSHOLM und RANDLE 1961, LOWRY et al. 1964).

1. Erste Ansätze zur Isolierung aktiver PFK

Die große physiologische Bedeutung der PFK im Kohlenhydratstoffwechsel, vergleichbar mit der Glykogenphosphorylase, veranlaßte viele Arbeitsgruppen, die regulatorischen Eigenschaften dieses Enzyms näher zu untersuchen.

Erste Versuche zur Isolierung aktiver PFK scheiterten an der Instabilität des Enzyms (MUNTZ 1953). Nachdem Fruktose-1.6-bisphosphat als Stabilisator bei der Isolierung erkannt worden war (WAKID und MANSOUR 1965), gelang die Reinigung von PFK aus Schafsherz (PARMEGGIANI und KREBS 1965). Weitere Isolierungen aus Kaninchenmuskel (PARMEGGIANI et al. 1966), Ochsenherzmuskel (MANSOUR et al. 1966), *Escherichia coli* (BLANGY 1968), *Clostridium pasteurianum* (UYEDA und KUROOKA 1970), Kaninchenleber (KEMP 1971) folgten.

2. Lokalisation der PFK in der Zelle

Wie die bisherigen Präparationen von PFK gezeigt haben, handelt es sich um ein im Cytosol lokalisiertes Enzym. Im Gegensatz dazu fanden MANSOUR und Mitarbeiter (1966) bei der Isolierung von PFK aus Schafs-, Schweine- und Rinderleber keine Aktivität in der löslichen Fraktion. Der Nachweis der Enzymaktivität war erst nach Behandlung mit ATP und Magnesiumsulfat möglich. Da diese Befunde nicht reproduzierbar waren, führten die Autoren ihre Ergebnisse auf Artefakte während der Präparation zurück.

3. Verhalten homogener PFK bei der analytischen Ultrazentrifugation

Daten über die molekulare Struktur der PFK sind erst seit Mitte der sechziger Jahre vorhanden. Im wesentlichen beschränken sich diese Informationen auf Präparationen des Enzyms aus tierischem Gewebe.

Bei der Analyse von Muskel PFK in der analytischen Ultrazentrifuge ergaben sich in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration drei sedimentierende Grenzsichten mit Sedimentationskonstanten von 13,8S, 20,9S und 31S (LING et al. 1965). Die Reduktion der Proteinkonzentration unter 5 mg/ml führte zu nur einer Grenzsicht. Für das biologisch aktive PFK Molekül wurde ein Molekulargewicht von 380.000, entsprechend einer Sedimentationskonstanten von 13,1S bestimmt (PAETKAU und LARDY 1967). PARMEGGIANI und Mitarbeiter (1966) konnten zeigen, daß die zur Sedimentation verwendeten Puffer das Verteilungsmuster der PFK beeinflussen.

Die heterogene Verteilung der PFK bei der Sedimentation ist nicht, wie sich später herausstellte Ursache von Fremdprotein, sondern vielmehr bedingt durch ein reversibles Gleichgewicht verschiedener PFK Aggregationsformen (FRIEDEN 1971).

Die Tendenz zur Aggregation ist bei hoch gereinigten PFK Präparationen weitaus stärker ausgeprägt als in Roh- oder teilweise gereinigten Extrakten (PARMEGGIANI et al. 1966).

Einen Beweis für das Aggregationsverhalten gereinigter PFK erbrachten WENZEL und Mitarbeiter (1972). Auf Sepharose 4B chromatographierte Erythrocyten PFK spaltet in fünf aktive Fraktionen auf. Die Rechromatographie einer dieser Proteinmaxima führt ebenfalls zu fünf aktiven Fraktionen.

4. Molekulargewichte nativer und dissoziierter PFK aus Eukaryonten

Das biologisch aktive PFK Molekül bei Eukaryonten hat, wie aus den bisherigen Messungen hervorgeht, ein Molekulargewicht von 320.000 - 380.000; die beobachteten Aggregate liegen zwischen 770.000 und 5.000.000 Dalton (HOFMANN 1976).

Die Frage nach der kleinsten Untereinheit des PFK Moleküls erbrachte keine eindeutige Klärung. KEMP und KREBS (1967) identifizierten ein Protein von 90.000 Dalton. PAETKAU und LARDY (1967) erhielten bei der Behandlung mit 4 M SDS ein Protein mit einem Molekulargewicht von 93.000. LEONHARD und

WALKER (1972) bestimmten als kleinste Einheit ein Protein von 76.000 Dalton.

Behandlung nativer PFK mit 6 M Guanidiniumchlorid führte zu Untereinheiten von 47.000 Dalton und 24.000 Dalton (PAETKAU et al. 1968). Inwieweit es sich bei diesen Formen um echte Untereinheiten handelt, ist nach neueren Untersuchungen zumindest zweifelhaft, da für Lactatdehydrogenase gezeigt werden konnte, daß hohe Guanidiniumchlorid Konzentrationen einen Kettenbruch herbeiführen können (FOSMIRE und TIMASHEFF 1972).

Der Nachweis, daß es sich um strukturell identische Untereinheiten handelt, ist bis jetzt nur für Kaninchen Erythrocyten PFK erbracht worden (TARUI et al. 1972).

Molekulargewichtsbestimmungen an Muskel PFK aus der Aminosäurezusammensetzung sind nicht in Übereinstimmung mit den mit anderen Methoden gemessenen (PAETKAU et al. 1968). Demnach ist wahrscheinlich, daß noch andere Komponenten, Lipide oder Kohlenhydrate, am Aufbau des PFK Moleküls beteiligt sind.

5. Molekulargewichte nativer und dissoziierter PFK aus Prokaryonten

Im Gegensatz zu der aus Eukaryonten isolierten PFK steht die der Prokaryonten.

UYEDA und KUROOKA (1970) isolierten und kristallisierten PFK aus *Clostridium pasteurianum*. Das Molekulargewicht konnte von den Autoren zu 144.000, entsprechend einer Sedimentationskonstanten von 7,8S, bestimmt werden. Die kleinste Untereinheit nach SDS und 8 M Harnstoff Behandlung ergab ein Molekulargewicht von 35.000.

BLANGY (1968) isolierte PFK aus *Escherichia coli* und bestimmte das Molekulargewicht zu 142.000, entsprechend einer Sedimentationskonstanten von 7,8S. In 6 M Guanidiniumchlorid wurde für die kleinste Untereinheit ein Molekulargewicht von 36.000 bestimmt.

6. Vergleich zwischen Pro- und Eukaryonten PFK

Vergleicht man die molekularen Parameter von Pro- und Eukaryonten PFK, so ergibt sich für das aktive PFK Molekül ein oligomeres Protein, das aus einzelnen Protomeren zusammengesetzt ist. Nach den gemessenen Molekulargewichten des aktiven und dissoziierten PFK Moleküls sind allgemein sowohl bei Pro- als auch Eukaryonten vier Protomere am Aufbau des tetrameren aktiven Enzyms beteiligt.

Es sei jedoch darauf hingewiesen, daß LEONHARD und WALKER (1972) als kleinste Untereinheit für Muskel PFK ein Molekulargewicht von 76.000 angeben. Nach dieser Konzeption ergibt sich ein hexameres PFK Molekül, das aus sechs Untereinheiten besteht. Im Gegensatz dazu stehen die Befunde von TELFORD und Mitarbeitern (1975), die eine hexamere Aggregationsform in Frage stellen aufgrund von Vernetzungsexperimenten.

7. Elektronenmikroskopische Untersuchungen an PFK

Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Kaninchenmuskel PFK (TELFORD et al. 1975) haben gezeigt, daß das tetramere PFK Molekül folgende Abmessungen hat: $130 \text{ \AA} \times 83 \text{ \AA} \times 25 \text{ \AA}$. Für das Protomere ergab sich ein längliches Ellipsoid mit den Abmessungen $25 \text{ \AA} \times 67 \text{ \AA} \times 25 \text{ \AA}$. Das Dimere entsteht durch Anlagerung längs der $25 \text{ \AA}$ Achse und bildet die Grundeinheit zu einer weiteren Aggregation.

8. PFK Isoenzyme

Hinweise für das Vorhandensein von PFK Isoenzymen ergaben Untersuchungen an Patienten mit Muskelatrophie, bei denen die Aktivität der Muskel PFK deutlich reduziert war gegenüber der PFK Aktivität aus Erythrocyten und Leukocyten (TARUI et al. 1965, LAYZER et al. 1967).

Da es sich hier um eine Erbkrankheit handelt, ist zu folgern, daß diese drei Enzyme an unterschiedlichen Genloci codiert werden.

Immunologische Untersuchungen an Muskel und Erythrocyten PFK führten zu vergleichbaren Ergebnissen (TARUI et al. 1972).

9. Reaktionsmechanismus der PFK

Wie aus der Reaktionsgleichung der PFK hervorgeht, sind ATP und Fruktose-6-phosphat die Substrate des Enzyms.

Die Analyse einer bimolekularen Reaktion wird möglich durch Messen der Anfangsgeschwindigkeit in Gegenwart konstanter Konzentrationen eines der beiden Substrate. Die Steigung der Geraden und der Schnittpunkt mit der Ordinate ermöglichen in der doppelt reziproken Auftragung die Unterscheidung zwischen den einzelnen Reaktionsmechanismen (CLELAND 1963).

Darstellungen entsprechender Messungen ergeben für Kaninchenmuskel PFK (UYEDA 1970), Rinderherz PFK (HULME und TIPTON 1971), Hefe PFK (VINUELA et al. 1963), menschlicher Muskel PFK (LAYZER et al. 1969) parallele Geraden, Hinweis eines Ping-Pong Mechanismus.

Im Gegensatz dazu stehen die Untersuchungen von HANSON und Mitarbeitern (1973), die für Kaninchenmuskel PFK einen ungeordneten sequentiellen Reaktionsmechanismus nachgewiesen haben. BRAND und SÜLING (1974) geben für Rattenleber PFK einen geordneten sequentiellen Mechanismus an.

10. Allosterischer Charakter der PFK

Der allosterische Charakter des Enzyms ist entscheidend davon abhängig, aus welchem Organismus das Enzym isoliert worden ist. Kaninchenmuskel PFK wird in Gegenwart hoher ATP Konzentrationen gehemmt (UYEDA und PACKER 1965), während PFK, isoliert aus *Clostridium pasteurianum* (UYEDA und KUROOKA 1970), *Flavobacterium thermophilum* (YOSHIDA 1972) und *Dictostelium discoideum* (BAUMANN und WRIGHT 1968) durch ATP nicht gehemmt werden. Auffallend ist die Tatsache, daß Mikroorganismen, die nicht Glukose als Energiequelle benutzen, ATP insensitive Enzymformen besitzen.

Andere Hemmstoffe der PFK Aktivität sind Citrat (GARLAND et al. 1963), Phosphoenolpyruvat (KELLY und TURNER 1968, YOSHIDA 1972), Adenosindiphosphat (GARRARD und HUMPHREYS 1968, DENNIS und COULTATE 1967), 2-Phosphoglycerat (KELLY und TURNER 1970), Phosphokreatin und Phosphoglukonat (KRZANOWSKI und MATSCHINSKY 1969). Die beobachtete Hemmung durch NADH_2 scheint eher unspezifisch, da Aldolase, das als Hilfsenzym zum Nachweis der PFK Aktivität verwendet wird, ebenfalls gehemmt wird (NEWS-HOLM et al. 1970).

PFK Inhibitoren wie z. B. ADP oder ATP führen in hohen Konzentrationen zu einem sigmoiden Kurvenverlauf bei variablen Fruktose-6-phosphat Konzentrationen. (ATKINSON und WALTON 1965, MANSOUR und AHLFORS 1968, BLANGY et al. 1968) mit Ausnahme der Hefe PFK (ATKINSON et al. 1965). Inhibitoren beeinflussen bei der Hefe PFK die Kooperativität nicht.

11. Bedeutung der regulatorischen Eigenschaften der PFK für die Glykolyse

Wie aus den oben angeführten Inhibitorexperimenten und entsprechenden kinetischen Messungen hervorgeht, ist die Regulation der PFK Aktivität im besonderen Maße abhängig von der vorliegenden Purin Oszillation.

Bei fakultativen Anaerobiern ist eine gesteigerte Glykolyse rate zu beobachten, wenn man sie anaeroben Bedingungen aussetzt (Pasteur Effekt). Die Ursache dieser Steigerung ist darin zu sehen, daß durch die fehlende oxidative Phosphorylierung die Energie über die Glykolyse bereitgestellt werden muß. Die regulatorischen Eigenschaften der PFK Aktivität, besonders die Empfindlichkeit gegenüber ATP veranlaßte CORI 1942 zu der Hypothese, in der PFK ein Regulatorenzym der Glykolyse zu sehen.

Unter anaeroben Bedingungen kommt es zu einer Anreicherung von AMP und ADP, die begleitet ist von einer Abnahme der ATP Konzentration. Da diese Metabolite bei vielen Organismen als positive Effektoren identifiziert worden sind (PASSONEAU und LOWRY 1962, KEMP 1969), ist eine Regulation über diese Nukleotide sehr wahrscheinlich.

Eine Ausnahme der Nukleotidregulation bildet die PFK aus Hefen. Der ATP Spiegel bleibt unter aeroben und anaeroben Bedingungen konstant (LYNEN et al. 1959). Die Regulation der Enzymaktivität wird hier im wesentlichen vom Citrat übernommen. SALAS und Mitarbeiter (1965) konnten zeigen, daß unter anaeroben Bedingungen die endogene Citratkonzentration abnimmt. Parallel dazu steigt die Enzymaktivität der PFK, was zu einem Ansteigen der Glykolyserate führt.

12. Problemstellung

Da die bisherigen Daten über PFK vornehmlich von tierischen Präparationen stammen, soll hier der Versuch unternommen werden, diese mit einer aus Pflanzenzellen isolierten PFK zu vergleichen.

Als Objekt wurde die einzellige Grünalge *DUNALIELLA salina*, die in die Ordnung der Volvocales gehört, gewählt, da sie stammesgeschichtlich am Ursprung der Entwicklungslinie von höheren Tieren und Pflanzen steht.

Die erste Aufgabe bestand darin, ein Isolationsverfahren zu erarbeiten und die Lagerungsbedingungen der Präparation zu untersuchen. An der gereinigten PFK soll die Charakterisierung auf molekularer Ebene erfolgen.

Kinetische Messungen zur Charakterisierung des Reaktionsmechanismus wurden nach der Cleland Nomenklatur ausgewertet, um Aussagen über den Reaktionsablauf der *DUNALIELLA* PFK im Vergleich zu den bereits vorliegenden Daten anderer Präparationen zu machen. Weiterhin soll das allosterische Verhalten der *DUNALIELLA* PFK untersucht werden.

MATERIAL UND METHODEN

1. Zellmaterial

Die für die vorliegenden Untersuchungen verwandte Grünalge *Dunaliella salina* stammt aus einer Dauerkultur, die mir von Herrn Prof. Dr. Werz freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurde.

Der Flagellat wurde 1838 von DUNAL in den rotgefärbten Salzwasserbecken Südfrankreichs entdeckt und in die Familie der Chlamydomonadaceen eingeordnet. Nähere Untersuchungen von TEODORESCO, der diesen Organismus als *Dunaliella salina* bezeichnete, führten zu dem Ergebnis, daß Dunaliellen im Gegensatz zu den Chlamydomonadaceen keine feste Zellulosewand besitzen. Eine Neueinordnung in die Familie der Polyblepharidaceen, nackte Vertreter aus der Ordnung der Volvocales, war die Folge (HAMBURGER 1905, TEODORESCO 1905, 1906 a u. b). In der neueren systematischen Nomenklatur bilden die Dunaliellen eine eigene Familie. In der Unterordnung der Chlamydomonadineae sind in der Familie der Dunaliellaceae Organismen mit nacktem Protoplast zusammengefaßt (FOTT 1971).

Untersuchungen an einer Reihe von Dunaliellen unterschiedlicher Herkunft zur Klassifizierung der Gattung haben ergeben, daß sich die Arten im wesentlichen in ihrer Größe und den Ansprüchen an die Salzkonzentration unterscheiden (LERCHE 1937).

Die Zellen sind etwa 10μ groß und von keiner festen Zellulosewand umgeben. Charakteristisch ist der becherförmige Chloroplast, in dessen Aushöhlung der Zellkern lokalisiert ist. Im distalen Teil der Zellen sind die zwei isokonten Geißeln inseriert, zwischen Geißelapparat und Zellkern liegt der Golgi Apparat (WERZ und KELLNER 1970).

2. Zellkultur

Die Zellen wurden in einem voll definierten Salzmedium (Tab. 1) im Dauerlicht, 12.000 Lux, bei 18°C unter stetiger Belüftung

in 5 Liter Erlenmeyerkolben angezogen. Als Lichtquelle wurden Quecksilberhochdrucklampen der Firma OSRAM (HQL 250 W) verwendet.

Tab. 1. ASP Medium für *Dunaliella* nach McLACHLAN (1960)

NaCl	410 mM	FeCl ₃ ·6H ₂ O	1.5 µM
MgSO ₄ ·7H ₂ O	24 mM	H ₃ BO ₄	185.00 µM
MgCl ₂ ·6H ₂ O	20 mM	MnCl ₂ ·4H ₂ O	7.00 µM
CaCl ₂ ·2H ₂ O	10 mM	ZnCl ₂	0.8 µM
K ₂ HPO ₄	100 µM	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.02 µM
KNO ₃	1 mM	CuCl ₂ ·2H ₂ O	0.0002µM
Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O	100 µM	Na ₂ -EDTA	30.00 µM

Die Stammkultur wurde in 200 ml Erlenmeyerkolben ohne Belüftung kultiviert. 5 ml Zellsuspension wurden in 100 ml sterilen Kulturmediums suspendiert und unter gleichen Bedingungen wie oben angegeben aufgezogen. Eine Übertragung in frisches Medium war ca. alle sechs Wochen erforderlich.

Für jede Versuchsreihe wurde eine 20 Liter Kultur, entsprechend einem Frischgewicht von 12 - 15 g, angesetzt, die nach 10 Tagen, in der späten logarithmischen Phase, aufgearbeitet wurde.

3. Aufarbeitung

Die Zellen wurden in der CHRIST UNIVERSAL JUNIOR III SD bei 5000 Umdrehungen pro Minute für 15 Minuten sedimentiert. Die erhaltenen Niederschläge wurden vereint und dreimal in Isolationspuffer, 0.1 M Kaliumdihydrogenphosphat, pH 6.8, 0.01 M Ammoniumsulfat, 0.001MNa₂-EDTA und 0.003 M β-Mercaptoäthanol in der CHRIST Minifuge bei 4000 Umdrehungen pro Minute gewaschen. Derartig präparierte Zellen können ohne Schaden für

mehrere Monate bei -20°C bis zur Isolation der PFK gelagert werden.

3.1. Isolation von Dunaliella PFK

Das Aufbrechen der Zellen erfolgte in einem Porzellanmörser. Das gewaschene Sediment aus der Aufarbeitung wurde mit 35 g Aluminiumoxid (ALCOA) versetzt und im Eisbad 30 Minuten homogenisiert. Das Gesamtvolumen des Zellbreies nach dem Homogenisieren wurde mit Isolationspuffer auf 100 ml eingestellt. Zur Entfernung des ALCOA wurde der Zellbrei 15 Minuten in der CHRIST Minifuge zentrifugiert. Das zweimal gewaschene Sediment, vereint mit den Überständen, wurde anschließend bei 40.000 xg in der SORVALL RC 2B 40 Minuten abzentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde als Rohextrakt bezeichnet.

Zur weiteren Isolierung der PFK erfolgte eine Ammoniumsulfatfällung bis 60 %. 390 g Ammoniumsulfat pro Liter wurden dem Überstand unter Rühren über mehrere Stunden zugesetzt und über Nacht im Kühlraum stehengelassen. Der Niederschlag wurde bei 40.000 xg in der SORVALL für 30 Minuten abzentrifugiert und das Sediment in 20 ml Isolationspuffer aufgenommen. Anschließend wurde für 12 Stunden gegen Isolationspuffer dialysiert.

Die Konzentrierung des Dialysats erfolgte durch Druckdialyse (SATORIUS SM 16305) auf 10-12 ml. Das so erhaltene Konzentrat wurde in 2 ml fraktioniert und bis zur weiteren Präparation bei -20°C aufbewahrt.

3.2. Reinigung der Dunaliella PFK

Die Reinigung der Dunaliella PFK erfolgte mit Hilfe verschiedener Säulenchromatographischer Methoden.

Die Vorfraktionierung des eingeengten Dialysats wurde auf einer Sephadex G 100 Säule (1.5 x 50 cm), die mit Säulenpuffer, 0.05 M Dikaliumhydrogenphosphat, pH 7.5, 0.01 M Ammoniumsulfat, 0.001 M $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ und 0.003 M β -Mercaptoäthanol äquilibriert war, durchgeführt. Zur Fraktionierung wurden 5 mg Gesamtprotein aufgetragen und 3.3 ml pro Fraktion mit einem GILSON

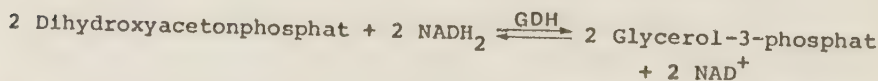
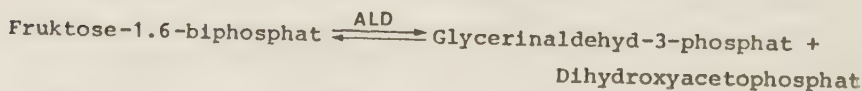
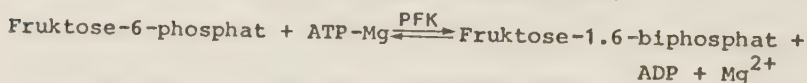
Microcol TDC 80 gesammelt. Fraktionen mit PFK Aktivität wurden vereint und eingeeengt.

Zur weiteren Reinigung wurde die eingeeengte G 100 Präparation über eine Sephadex G 200 Säule (2.5 x 30 cm) aufgetrennt.

Nach Konzentrierung des Eluats der Sephadex G 200 Chromatographie erfolgte weitere präparative und analytische Trennung auf einer Agarose Säule Bio Gel A 1.5 m (1.5 x 50 cm).

4. Nachweis der PFK Aktivität

Die PFK Aktivität wurde mit Hilfe des gekoppelten enzymatischen Tests mit Aldolase (ALD), Glycerin-3-phosphatdehydrogenase (GDH) und Triosephosphatisomerase (TIM) nach folgender Reaktionsgleichung nachgewiesen (RACKER 1947):



Daraus ergibt sich für die Berechnung des umgesetzten Fruktose-6-phosphats, daß ein Mol Fruktose-1.6-biphosphat zwei Molen NAD^+ äquivalent ist.

Als Standardnachweis der PFK Aktivität wurde folgender Ansatz verwendet: 50 mM Dikaliumhydrogenphosphat, pH 8, 1.9 mM Magnesiumchlorid neutralisiert, 0.66 mM Adenosintriphosphat Dinatriumsalz, 10 mM Fruktose-6-phosphat Dinatriumsalz, 0.56 mM NADH_2 , 1.1 Einheiten Aldolase (EC 4.1.2.13), 1.8 Einheiten Glycerin-3-phosphatdehydrogenase (EC 1.1.1.8) und 25 Einheiten Triosephosphatisomerase (EC 5.3.1.1). Die Reaktion wurde mit einem Aliquot der jeweils zu untersuchenden Probe gestartet. Das Gesamtvolumen des Testansatzes betrug 2.5 ml. Gemessen wurde die Extinktionsabnahme bei 340 nm in einem BECKMAN Spektralphotometer Modell 25. Die Reaktion wurde auf dem dazuge-

pro Fraktion wurden mit dem GILSON Microcol TDC 80 gesammelt. Die Auswertung der Säulenchromatographie erfolgte nach ACKERS (1970).

5.2. Präparative und analytische Gelelektrophorese

Polyacrylamidgelelektrophorese nativer PFK erfolgte in 4 % igen Polyacrylamidgelen, zur Herstellung der Gele siehe Tab. 2. Bei Verwendung geringer % iger Gele wurde Lösung Nr. 2 entsprechend verdünnt. Das Verhältnis Polyacrylamid zu N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin war bei allen Gelen 30 : 1. Das Gießen der Gele erfolgte in Plexiglasröhrchen 0.5 x 8 cm, die Entwicklung der Elektropherogramme wurde mit 3 mA pro Röhrchen in einer DESAGA Heidelberg Elektrophoreseapparatur durchgeführt. Nach dem Lauf wurden die Gele mit 0.5 % iger Amidoschwarzlösung in 7 % iger Essigsäure für 30 Minuten angefärbt. Die Entfärbung erfolgte in 7 % iger Essigsäure über Nacht.

Die Molekulargewichtsbestimmung nativer PFK erfolgte nach der Methode von HEDRICK und SMITH (1968) mit 4 %, 6 %, 8 % und 10 % igen Gelen. Als Eichproteine wurden Katalase, Aldolase, Rinderserumalbumin und Hühnereialbumin je 40 µg pro Röhrchen verwendet. Parallel dazu wurden Molekulargewichtsbestimmungen auf 4 % igen Gelen mit den gleichen Eichproteinen durchgeführt.

Die Molekulargewichtsbestimmung aus den Untereinheiten dissoziierter PFK erfolgte auf 8 % igen Polyacrylamidgelen, die 0.1 % Natriumdodecylsulfat enthielten nach der Methode von WEBER und OSBORN (1969). Als Eichproteine wurden Rinderserumalbumin, Aldolase, Chymotrysinogen und Cytochrom c verwendet. Die Dissoziation der PFK in Protomere wurde in 0.05 M Natriumphosphatpuffer, pH 7.5, der 1 % Natriumdodecylsulfat enthielt, bei 37°C für 20 Stunden durchgeführt.

Der enzymatische Nachweis der PFK auf einem 4 % igen Polyacrylamidgel erfolgte mit Phenazinmethosulfat (PMS) und Nitroblau-tetrazoliumsalz (NBT) nach der Methode von BROCK (1969). Nach dem Lauf wurden die Gele in folgendem Medium für 3 Stunden im Dunkeln inkubiert: 0.05 M Dikaliumhydrogenphosphat, pH 8, 2.8 mM Magnesiumchlorid neutralisiert, 1.22 mM Adenosinriphosphat Dinatriumsalz, 20 mM Fruktose-6-phosphat, 0.3 µM NAD⁺,

Tab. 2.

Gelsystem nach ORNSTEIN und DAVIS (1964) für ein 10 % iges Polyacrylamidgel

Lsg. Nr.	Bestandteile pro 50 ml aqua dest.		
1	24 ml	1 N HCL	
pH 8.9	18.3 g	Tris (Trihydroxymethylaminomethan)	
	0.115 ml	N,N,N',N' Tetramethyläthylendiamin	
2	20 g	Acrylamid	
	0.66 g	N.N' Methylenbisacrylamid	
3	0.07 g	Anmoniumperoxydisulfat	

Elektrodenpuffer: pH 8.3, vor Gebrauch 1:10 verdünnt

6 g Tris
28.8 g Glycin
auf 1000 ml

Herstellung des Trenngels: 1 Teil Lsg. Nr. 1
2 Teile Lsg. Nr. 2
1 Teil aqua dest.
4 Teile Lsg. Nr. 3

1.7×10^{-3} mM PMS, 5 μ M NBT, 4.4 Einheiten Aldolase, 7.2 Einheiten Glycerin-3-phosphatdehydrogenase und 100 Einheiten Triosephosphatisomerase. Parallelansätze ohne Fruktose-6-phosphat bzw. Adenosintriphosphat dienten als Kontrolle. Konservierung und Lagerung der Gele erfolgte in 7% iger Essigsäure.

5.3. Ultrazentrifugation

Zur Bestimmung der Sedimentationskonstanten und der Molekulargewichte der gereinigten PFK Präparation wurden die Techniken der analytischen Ultrazentrifugation und der Bandensedimentation im linearen Saccharosegradienten nach der Methode von MARTIN und AMES (1961) eingesetzt. Sedimentationsläufe wurden in der analytischen Ultrazentrifuge BECKMAN Modell E mit RTC (Temperaturkontrolle), Overspeedkontrolle und photoelektrischem Scanner in einem An-D 6 Loch Rotor bei 4°C durchgeführt. Die Sedimentationsläufe der PFK, 15 mg/ml, wurden bei 534 nm mit der Schlierenoptik verfolgt. Die Probe wurde in einer Doppelsektorzelle mit Quarzfenster untersucht. Nach Erreichen der Nenndrehzahl von 45.000 Umdrehungen pro Minute erfolgten im Abstand von 4 Minuten die Sedimentationsaufnahmen bei einem Schlierenwinkel von 70°. Um die Konzentrationsabhängigkeit der Sedimentationskonstanten von der eingesetzten PFK-Menge zu verfolgen, wurden Verdünnungsreihen bis zu einer optischen Dichte von $A_{280} = 0.05$, die mit dem photoelektronischen Scanner bei 280 nm aufgenommen wurden, hergestellt. Die Berechnung der Sedimentationskonstanten bezogen auf Standardbedingungen erfolgte durch graphische Darstellung von $\log r$ gegen die Zeit (Integrationsverfahren). Die Steigung der resultierenden Geraden ergibt nach

$$s_{app.} = \frac{2.303 \cdot t_g}{60 \omega^2}$$

den scheinbaren Sedimentationskoeffizienten $s_{app.}$ (ELIAS 1969).

Saccharosegradientenzentrifugation wurde in einer BECKMAN L2 65 B Ultrazentrifuge bei 4°C in einem SW 41 Rotor durchgeführt. Lineare Saccharosegradienten wurden mit einem Gradientenformer durch Mischen einer 10 % igen und 40 % igen Saccharoselösung (w/w) in Säulenpuffer hergestellt. Je Lauf wurden 300 µg PFK aufgetragen und 16.5 Stunden bei 30.000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Das Austropfen erfolgte durch Anstechen der Zentrifugenröhrchen von unten, gesammelt wurden 0.33 ml pro Fraktion. Der Nachweis der PFK Aktivität wurde mit dem Standardtestansatz durchgeführt.

Die Proteinbestimmung erfolgte entweder durch Messen der Absorption bei 280 nm oder durch Folin Reagenz nach der Methode von GERHARDT und BEEVERS (1968). Die Linearität der Gradienten wurde durch Messen des refraktiven Indexes in einem ABBE Refraktometer der Firma ZEISS überprüft. Die Berechnung der Sedimentationskonstanten erfolgte nach der Methode von MCEWEN (1967).

Proteinbestimmung

Proteinbestimmungen wurden nach der Methode von LOWRY et al. (1951) mit Folinreagenz und Rinderserumalbumin als Standard durchgeführt. Bei gereinigten PFK Proben erfolgte die Proteinbestimmung durch Messen des Quotienten A_{280}/A_{260} nm nach der Methode von WARBURG und CHRISTIAN (1941). Die Säulenprofile wurden durch Messen der Absorption bei 280 nm ermittelt.

Chemikalien

Adenosintriphosphat, Adenosindiphosphat, Fruktose-6-phosphat, Fruktose-1.6-biphosphat, Phosphoenolpyruvat, NAD^+ und $NADH_2$, Aldolase, Glycerin-3-phosphatdehydrogenase, Triosephosphatisomerase, Pyruvatkinase und die Eichproteine für die Elektrophorese und die Säulenchromatographie wurden von der Firma BOEHRINGER bezogen. Phenazinmethosulfat, Nitroblautetrazolium und die Chemikalien für die Disk Elektrophorese sind von der Firma SERVA. Alle anderen Chemikalien sind von der Firma MERCK mit dem Reinheitsgrad "pro analysi". Sephadex G 100 und G 200 sind von der Firma PHARMACIA (Uppsala), Bio Gel A 1.5 m von der Firma BIO RAD LABORATORIES (California).

ERGEBNISSE

1.1. Verhalten der Dunaliella PFK bei der Reinigung

Die Reinigung der *Dunaliella salina* PFK ist in Tab. 3 zusammengefaßt. Nach der Ammoniumsulfatfällung ist die Lagerung der PFK bei -20°C ohne Verlust der biologischen Aktivität über mehrere Monate möglich. Einfrieren hochgereinigter PFK führt beim Wiederauftauen zur Präzipitation. Die Lagerung des reinen Enzyms ist daher nur für kurze Zeit (ca. 4 Wochen) im Kühlschrank möglich.

Abb. 1 zeigt die nach der Ammoniumsulfatfällung erfolgte Gelchromatographie auf der Sephadex G 100 Säule. PFK Aktivität ist hier aufgrund des hohen Molekulargewichts im Ausschlußvolumen der Säule nachweisbar. Gleiches Verhalten der *Dunaliella* PFK war bei der Chromatographie auf Sephadex G 200 zu beobachten (Abb. 2).

Eine genaue Auftrennung der PFK in separate Proteinmaxima ist nach der Chromatographie auf einer Agarose Säule (Bio Gel A 1.5 m) möglich (Abb. 3). Wie aus der mit Eichproteinen kalibrierten Säule hervorgeht (Abb. 4), ergibt sich folgende Verteilung für die *Dunaliella* PFK. Das im Ausschlußvolumen erscheinende Proteinmaximum (M_I) ist auf Aggregationsformen mit einem Molekulargewicht über eine Million zurückzuführen. Dem zweiten Maximum (M_{II}) entspricht ein Molekül mit einem Molekulargewicht von 320.000. Das dritte zu beobachtende Maximum (M_{III}) ist einem Molekül mit einem Molekulargewicht von 200.000 zuzuordnen.

Wie aus der Verteilung der PFK Aktivität nach der Agarose Chromatographie hervorgeht, ist sie keinem der Proteinmaxima zuzuordnen, sondern erscheint separat zwischen dem ersten und zweiten Maximum. Für das Aktivitätsmaximum ergibt sich nach Abb. 4 ein Molekulargewicht von 380.000 Dalton.

Das Verhalten der *Dunaliella* PFK ähnelt also in bezug auf die Proteinverteilung dem der Kaninchenmuskel PFK (Abb. 3b).

Tab. 3. Reinigung der Dunaliella Phosphofruktokinase

Reinigungs- schritt	Gesamt- volumen ml	Gesamt- protein mg	Gesamt- aktivität U	Spezifische Aktivität $\text{mU} \cdot \text{mg}^{-1}$	Aus- beute %
Rohextrakt	190	212	15.3	70	100
Ammonium- sulfatfäll- lung	12.4	57	5.0	80	32.9
Sephadex G 100	16.8	32	4.8	100	31.5
Sephadex G 200	14.7	14	2.8	200	18.4
Bio-Gel A 1.5m	14.7	2	1.2	600	1.4

U = Enzymeinheit, Def. siehe Material u. Methoden

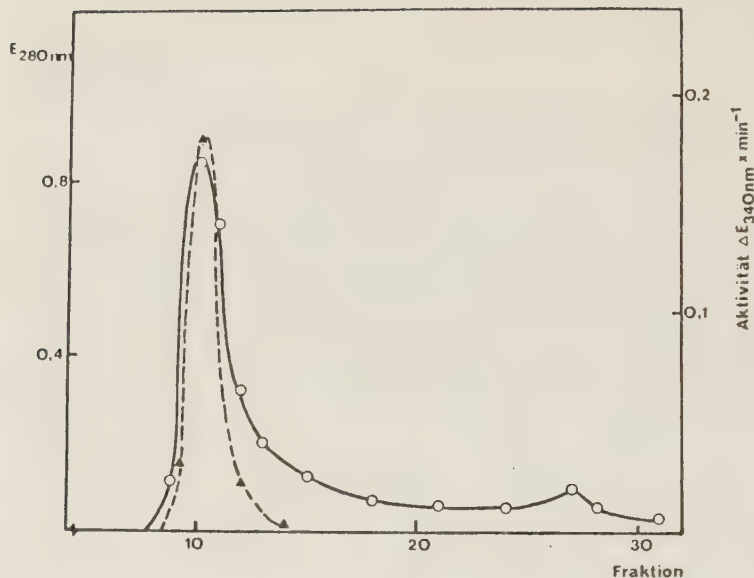


Abb. 1. Elutionsprofil der *Dunaliella* PFK nach Sephadex G100 Säulenchromatographie. Enzymaktivität (Δ) wurde mit einem Aliquot jeder Fraktion mit dem Standardtestansatz gemessen. 3.3 ml pro Fraktion wurden gesammelt. Durchflußgeschwindigkeit 10.8 ml pro Stunde. (○) optische Dichte bei 280 nm.

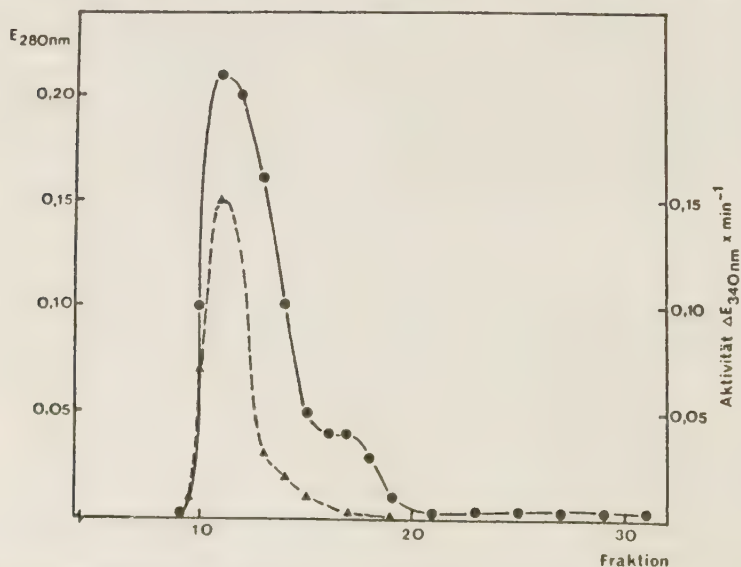


Abb. 2. Elutionsprofil der *Dunaliella* PFK nach Sephadex G200 Säulenchromatographie. (Δ) Enzymaktivität, (●) optische Dichte bei 280 nm. Die anderen Daten wie in Abb. 1.

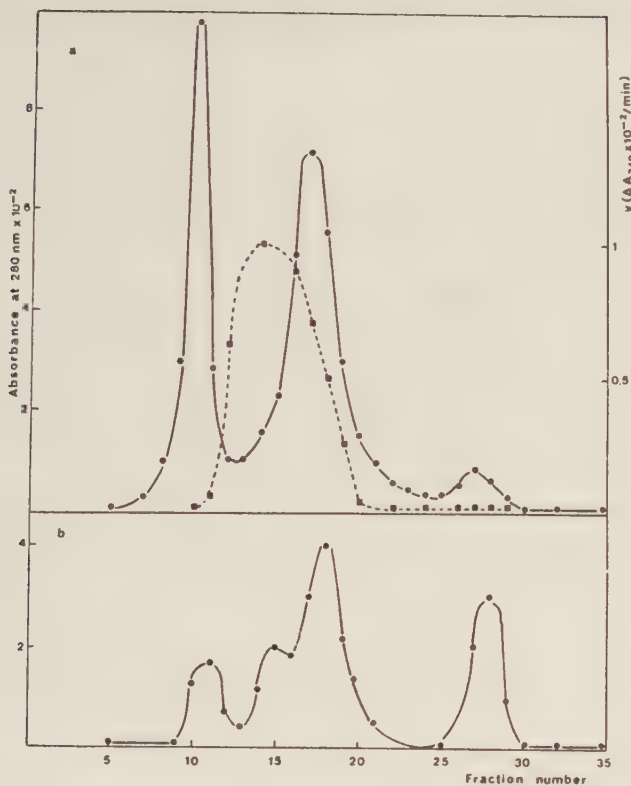


Abb. 3.

a) Elutionsprofil der *Dunaliella* PFK nach Bio Gel A 1.5 m Säulenchromatographie. (■) Enzymaktivität, (●) optische Dichte bei 280 nm.

b) Elutionsprofil von Kaninchenmuskel PFK (Boehringer) auf derselben Säule. (●) optische Dichte bei 280 nm. Die anderen Daten wie in Abb. 1.

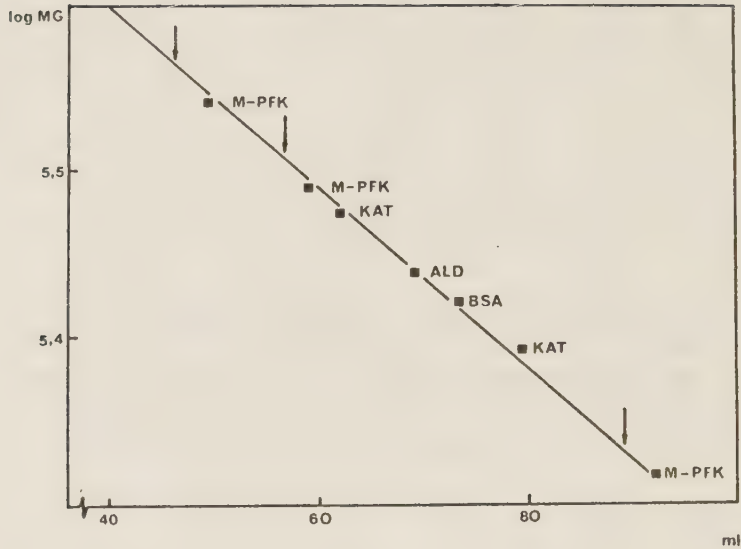


Abb. 4. Kalibrierte Bio Gel A 1.5 m Säule zur Molekulargewichtsbestimmung der nativen *Dunaliella* PFK.

Eichproteine: KAT (Katalase 240.000), ALD (Aldolase 158.000) und BSA (Rinderserumalbumin 60.000) je 1 mg/ml

Ordinate: Logarithmen der Molekulargewichte der Eichproteine

Abszisse: Elutionsvolumen in ml

M-PFK: Kaninchenmuskel PFK aus Abb. 3b

Pfeile markieren das Elutionsvolumen der *Dunaliella* PFK

1.2. Gelelektrophoretische Analyse der Fraktionen nach der Agarose A 1.5 m Chromatographie

Da PFK Aktivität isoliert vom Proteinmaximum auftritt, ergibt sich die Frage, inwieweit im Vergleich zu M_{II} Proteine unterschiedlichen Molekulargewichts vorliegen.

Bei der elektrophoretischen Auftrennung der Fraktionen 14 - 18 ergaben sich in einem 4 % igen Polyacrylamidgel keine Unterschiede in der elektrophoretischen Mobilität (Abb. 5). Es kann also davon ausgegangen werden, daß die biologische Aktivität der Dunaliella PFK auf das gleiche Protein zurückzuführen ist, wie M_{II} nach der Agarose Chromatographie.

Die elektrophoretische Darstellung der Proteine aus M_I ist wegen der großen Molekulargewichte in einem 4 % igen Polyacrylamidgel nicht möglich, die Proteine aus M_{III} ließen sich ebenfalls nicht darstellen.

Aufgrund des elektrophoretischen Verhaltens der PFK wurden Aktivitätsmaximum und Proteinmaximum II vereint und für die weiteren Messungen verwendet.

1.3. Physikalisch chemische Parameter der Dunaliella PFK

Um Aussagen über die molekulare Struktur der Dunaliella PFK zu machen, wurde das physikalisch chemische Verhalten des Enzyms mit verschiedenen Techniken untersucht.

1.3.1. Spektroskopische Messungen

Abb. 6 zeigt das Spektrum der gereinigten Dunaliella PFK. Das Absorptionsmaximum liegt bei 279 nm, das Verhältnis A_{280}/A_{260} beträgt 1.64. Aus diesem Spektrum berechnet sich der spezielle Extinktionskoeffizient $E_{279nm}^{1\%}$ zu $9.32 \text{ g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Charakteristisch für die Dunaliella PFK ist die bei λ 293 nm - 292 nm auftretende Schulter, die auf exponierte Tryptophanreste im Molekül schließen läßt.

Behandelt man das gereinigte Protein mit 0.1 N Natronlauge, so wird bei der Aufnahme des Spektrums die exponierte Stellung der Tryptophanreste noch deutlicher.

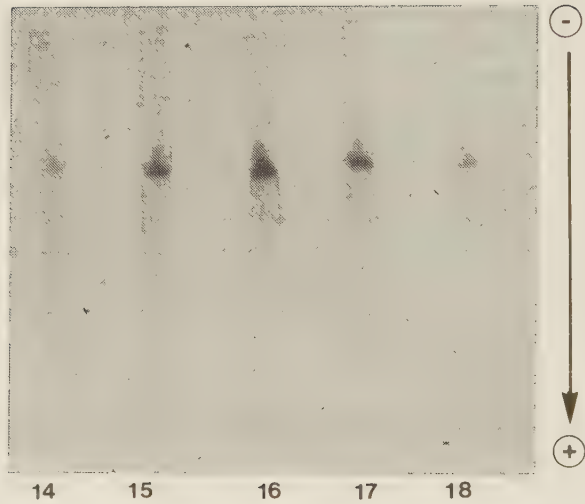


Abb. 5. Polyacrylamidgelelektrophorese der
Fraktionen 14 - 18 aus Abb. 3a in einem
4 %igen Gel. 200 μ l je Fraktion wurden pro
Gel aufgetragen.

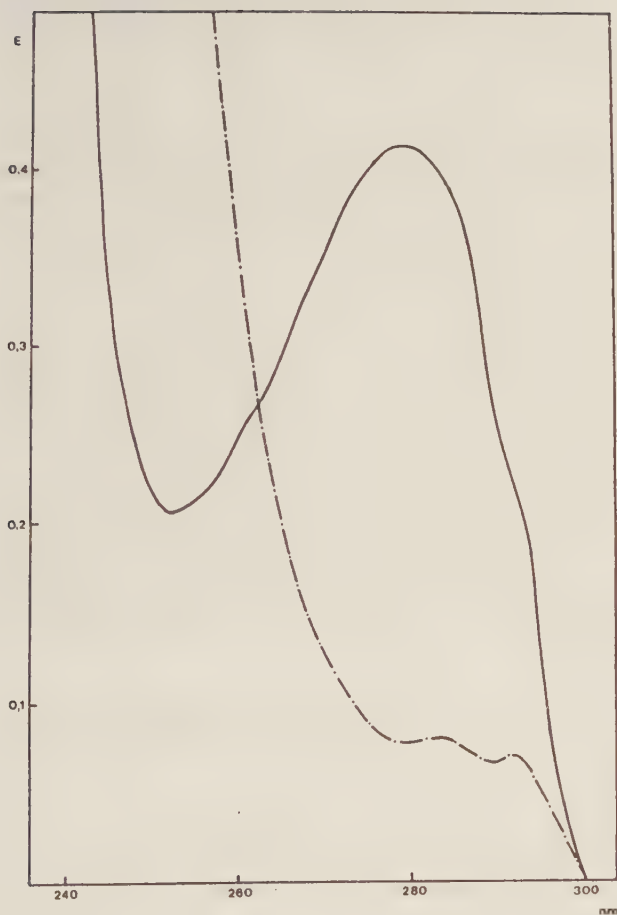


Abb. 6. Spektrum der gereinigten Dunaliella PFK.
(—) Dunaliella PFK gemessen in Phosphatpuffer
0.05 M, pH 7.5. (— · —) Dunaliella PFK gemessen in
NaOH 0.1 N.

1.3.2. Elektrophoretisches Verhalten der Dunaliella PFK

Die gelchromatographisch bestimmten Molekulargewichte wurden elektrophoretisch mit zwei Methoden überprüft.

Bei der Auftrennung nativer PFK in einem 4 % igen Polyacrylamidgel verhält sich das Enzym homogen, ein Aufspalten in separate Banden ist nicht zu beobachten (Abb. 7). Abb. 8 zeigt ein mit Eichproteinen kalibriertes Elektropherogramm. Das Molekulargewicht der Dunaliella PFK bestimmt sich daraus zu 320.000 Dalton. Da es sich hier um das aktive Molekül handelt, wurde durch enzymatischen Nachweis der PFK Aktivität auf dem Gel überprüft.

Da Form und Ladung eines Proteins für die Mobilität verantwortlich sind (SOBER et al. 1965), wurde die Mobilität bei verschiedenen Gelkonzentrationen gemessen. Stellt man die Mobilität der Proteine in Abhängigkeit der Gelkonzentration dar, resultieren Geraden, deren Steigung proportional dem Molekulargewicht ist. Die Auswertung eines solchen Experiments zeigt Abb. 9. Daß Molekulargewicht der Dunaliella PFK ergibt sich bei einem nach dieser Methode kalibrierten Elektropherogramm zu 330.000 Dalton.

1.3.3. Bandensedimentation im linearen Saccharosegradienten

Zentrifugation von Dunaliella PFK im Saccharose Dichtegradienten führt zu einem Aktivitätsmaximum bei einer Saccharosekonzentration von 19.5 % (Abb. 10). Dieser Konzentration entspricht ein Sedimentationswert von 20S. Die Proteinverteilung wie das Verhalten der PFK Aktivität ist vergleichbar der Agarose Gelchromatographie (siehe Abb. 3). Drei Proteinmaxima mit Sedimentationskonstanten von 15.8S, 18.3S und 39.5S lassen sich nachweisen.

1.3.4. Verhalten der Dunaliella PFK in der analytischen Ultrazentrifuge

Die Schlierenaufnahme in Abb. 11 gibt das Verhalten der PFK in 0.2 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7.8, in der analytischen



Abb. 7. Polyacrylamidgelelektrophorese nativer Dunaliella PFK in einem 4 %igen Gel. Proteinkonzentration: 40 μg pro Gel.

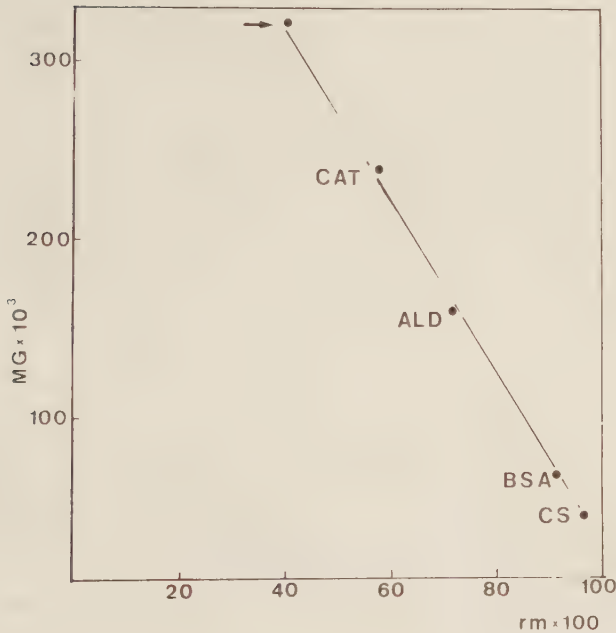


Abb. 8. Kalibriertes Elektropherogramm mit 4 %igen Polyacrylamidgelen zur Molekulargewichtsbestimmung nativer PFK. Eichproteine: CAT (Katalase 240.000), ALD (Aldolase 158.000), BSA (Rinderserumalbumin 60.000) und CS (Hühnereialbumin 45.000) je 40 μg pro Gel.
Ordinate: Molekulargewicht
Abszisse: rm = relative Mobilität der Proteine
Pfeil markiert die relative Mobilität der nativen Dunaliella PFK

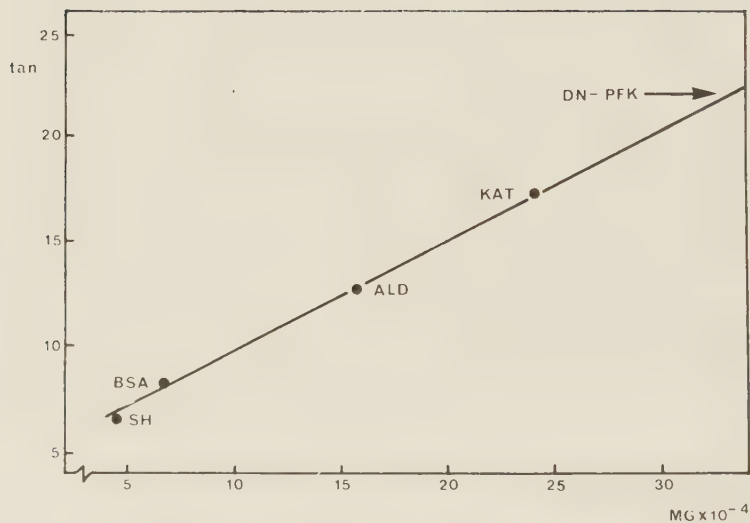


Abb. 9. Molekulargewichtsbestimmung nativer Dunaliella PFK nach der Methode von Hedrick und Smith (1968). Eichproteine: KAT (Katalase 240.000), ALD (Aldolase 158.000), BSA (Rinderserumalbumin 60.000) und SH (Eiweißalbumin 45.000) je 40 μg pro Gel.

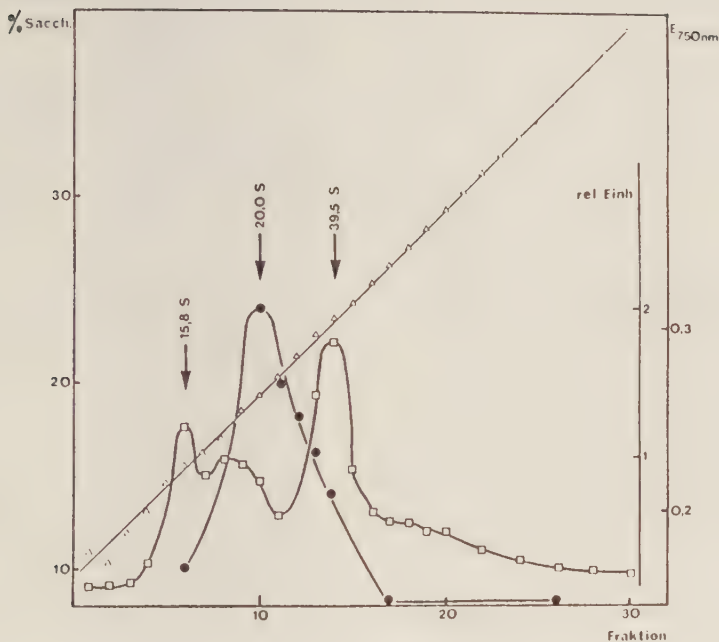


Abb. 10. Gradientenzentrifugation der *Dunaliella* PFK in einem linearen Saccharosegradienten von 10 % - 40 % (w/w) Saccharose. (Δ) % Saccharose, (□) Proteinbestimmung nach Lowry, angegeben ist die Extinktion bei 750 nm, (●) Aktivitätsbestimmung mit dem Standardtestansatz mit 100 μ l je Fraktion. Eine relative Einheit (rel. Einh.) entspricht $\Delta E_{340} \times 100/\text{min}$. 300 μ g Protein wurden für jeden Lauf aufgetragen, 330 μ l wurden pro Fraktion gesammelt. Rotor: SW 41, 16.5 Stunden, 30.000 U/min.

Ultrazentrifuge wider. Die graphische Auswertung der Sedimentationsläufe zeigt Abb. 12. Die Abstände r vom Rotationszentrum sind in logarithmischer Form in Abhängigkeit von der Zeit aufgetragen. Aus der Steigung der resultierenden Geraden wurde nach der unter Material und Methoden angegebenen Formel die Sedimentationskoeffizienten ermittelt.

Bei einer Proteinkonzentration von 15 mg/ml ergeben sich drei Sedimentationsbanden entsprechend Sedimentationskonstanten von 8.5S, 18.0S und 28.5S. Einem vierten nur schwach ausgeprägten Maximum läßt sich eine Sedimentationskonstante von 33.0S zuordnen. Mit steigender Proteinkonzentration nimmt die Höhe des 28.5S Gipfels zu, während bei den anderen beiden 18.0S und 8.5S keine Veränderung zu beobachten ist. Diese Banden zeigen also keine signifikante Veränderung bei der Variation der Proteinkonzentration.

Dieses Sedimentationsverhalten der Dunaliella PFK ist charakteristisch für ein Mehrkomponentensystem, das in einem reversiblen Gleichgewicht steht (FUYITA 1962, YPHANTIS 1964). Messungen in hoch verdünnten Lösungen, A_{280} 0.5 - 0.05, zeigen keine Konzentrationsabhängigkeit. Den Sedimentationsbanden sind Werte von 18.0S und 12.5S zuzuordnen. Verschiebungen in den stärker alkalischen Bereich von pH 8.5 - 9 führen zu einer Sedimentationsbande von 12.5S.

1.3.5. Theoretische Aspekte zur Molekulargewichtsbestimmung in der analytischen Ultrazentrifuge

Im Folgenden sollen die Schwierigkeiten der Molekulargewichtsbestimmung eines Mehrkomponentensystems wie es bei der Dunaliella PFK vorliegt aufgezeigt werden.

Das Charakteristische eines Mehrkomponentensystems sowohl bei der Molekulargewichtsbestimmung als auch bei hydrodynamischen Messungen besteht in der Abhängigkeit des durchschnittlichen scheinbaren Molekulargewichts ($M_{w,app}$) von der Proteinkonzentration. Diese Abhängigkeit wird beschrieben durch das thermodynamisch nicht ideale Verhalten des Gelösten in Abhängigkeit vom Lösungsmittel (Puffer, Ionenstärke, Wasserstoffionenkonzentration).

Das Molekulargewicht eines homogen idealen Systems läßt sich unter Vernachlässigung des zweiten Virialkoeffizienten ($B \cdot M_1$)

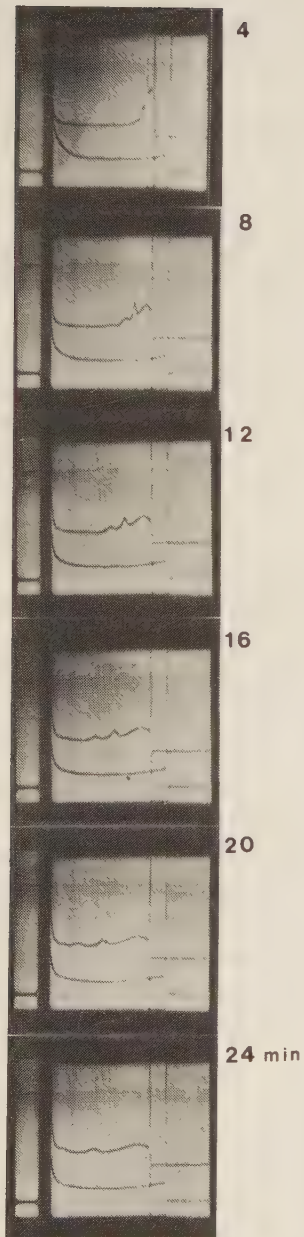


Abb. 11. Schlierenaufnahme der gereinigten *Dunaliella* PFK in der analytischen Ultrazentrifuge. Nach Erreichen der Nenndrehzahl von 45.000 U/min erfolgten die Aufnahmen im Abstand von 4 min. Sedimentationsrichtung von links nach rechts.

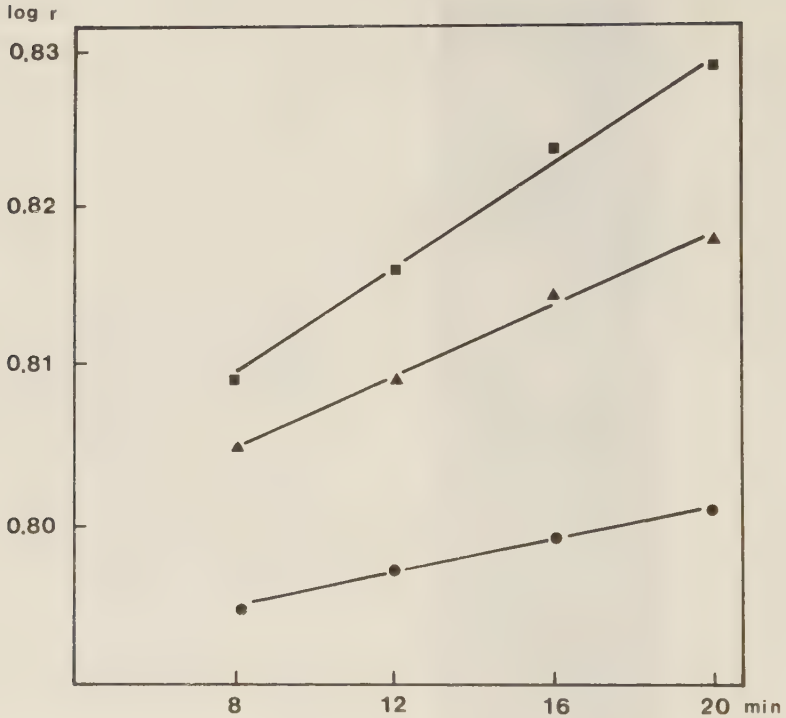


Abb. 12. Auswertung der Schlierenaufnahme der gereinigten *Dunaliella* PFK aus Abb. 11. Dargestellt ist der Logarithmus (r) des Abstandes Proteinpeak zum Rotationszentrum gegen die Zeit. Der Abstand (r) errechnet sich aus den Rotordaten

$$r = 7.35 - (0.467 \cdot x).$$

(■) 28.5S, (▲) 18.0S, (●) 8.5S

bestimmen, der nach der Formel $M_1/M_{w,app} = M_1/M_{w,app} + B \cdot M_1 C$ unabhängig von der Konzentration C wird.

Für reversible Assoziations-Dissoziationsgleichgewichte wie sie bei der Dunaliella PFK vorliegen, sind jedoch die Virialkoeffizienten zu berücksichtigen.

Berechnet man nach der Svedberg Gleichung

$$S = \frac{M \cdot (1 - \bar{v}\rho) \cdot D}{R \cdot T} = \frac{1}{\omega^2 t} \frac{dr}{r}$$

S = Sedimentationskonstante

M = Durchschnittlich scheinbares Molekulargewicht

$\bar{v}$ = partielles spezifisches Volumen

ρ = Dichte des Lösungsmittels

D = Diffusionskonstante

R = allgemeine Gaskonstante

T = absolute Temperatur

ω = Winkelgeschwindigkeit

r = Abstand vom Rotationszentrum zur Sedimentationsbande

die Molekulargewichte der Dunaliella PFK aus den entsprechenden Sedimentationskonstanten, so stehen diese Daten scheinbar im Widerspruch zu den vorher mit anderen Methoden bestimmten Molekulargewichten (Tab.4). Die Ursache für das Abweichen der rechnerisch ermittelten Molekulargewichte liegt darin:

- 1) Für alle vorkommenden Molekülformen der Dunaliella PFK wurde der gleiche Diffusionskoeffizient eingesetzt. Bei einem Mehrkomponentensystem ist der apparente Diffusionskoeffizient durch die Beziehung $D_{app} = D_0 (1 + R \cdot T \ln \mu_1)$ mit $\mu_1 = (\partial G / \partial n)_{T,p}$ und μ = chemisches Potential gegeben, so daß eine Gleichsetzung bei den einzelnen Komponenten nicht statthaft ist.
- 2) Da bei einer reversiblen Assoziation-Dissoziation der Diffusionskoeffizient auch von der Form des Moleküls abhängt (zweiter Virialkoeffizient), sind Formveränderungen in der Molekulargewichtsverteilung nicht berücksichtigt.

Aufgrund dieser reversiblen Assoziations-Dissoziations Erscheinungen der Dunaliella PFK ist nicht nur die Molekulargewichtsverteilung sondern auch die Bestimmung der S-Werte von der Konzentration sowie Formfaktoren abhängig.

Tab. 4. Übersicht über die mit verschiedenen Methoden bestimmten Molekulargewichte und Zuordnung zu einer Aggregationsform

Methode	S _{app.}	MWx10 ⁵	mögliche Teilchengröße
analytische Ultrazentri- fugation	33.0	8.5	Oktamer $\longleftrightarrow$ n-mer
	28.5	7.3	Tetramer $\longleftrightarrow$ Oktamer
	18.0	4.6	Tetramer
	8.5	2.2	Dimer $\longleftrightarrow$ Tetramer
Agarose- gelchromato- graphie		> 10	Aggregat
		3.8	Tetramer aktiv
		3.2	Tetramer inaktiv
		2.0	Dimer
SDS-Gelelek- trophorese		0.8	Monomer

MW = Molekulargewicht

Für die Berechnung des translatorischen Diffusionskoeffizienten wurde der experimentell ermittelte Wert 3.40×10^{-7} cm²/sec aus der Agarose Säule Bio Gel A 1.5 m (siehe Seite 43) eingesetzt.

Das partielle spezifische Volumen $\bar{v}$ ist in der Bestimmungsgleichung für $M_{w,app}$ ebenfalls eine Variable, da in einem Mehrkomponentensystem $\bar{v}$ bei der Zentrifugation von den in der Meßzelle auftretenden Drucken abhängig ist.

In einem Mehrkomponentensystem kann also mit Hilfe der Ultrazentrifugationstechnik nur eine relative Aussage über die Sedimentationskonstante gemacht werden, da der S-Wert nach

$$S = \frac{M_{w,app} (1 - \bar{v} \rho)}{N_L \cdot f}$$

N_L = Loschmidt'sche Zahl

f = Reibungskoeffizient

die anderen Größen siehe oben

vom Reibungskoeffizienten f abhängig ist.

Die Verteilung der Sedimentationskoeffizienten bei der Saccharosedichtegradientenzentrifugation (Bandensedimentation) unterliegt den gleichen oben dargestellten Gesetzmäßigkeiten, so daß diese Daten miteinander verglichen werden können.

1.3.6. Darstellung der Untereinheiten der Dunaliella PFK

Wie sich bei der Agarose Gelchromatographie, Saccharose Dichtegradientenzentrifugation und der analytischen Ultrazentrifugation gezeigt hat, treten mehrere Formen der Dunaliella PFK auf, die als Aggregations- und Dissoziationsformen des Moleküls gedeutet werden. Untersuchungen unter denaturierenden Bedingungen wurden zur Darstellung der kleinsten Untereinheit des Enzymmoleküls durchgeführt. Gleichzeitig war zu klären, ob diese Untereinheiten identisch sind.

Unter den experimentellen Bedingungen wurde mit Hilfe der SDS Gelelektrophorese nur eine Proteinbande auf einem 8 % igen

Polyacrylamidgel dargestellt (Abb.13). Aus kalibrierten SDS Elektropherogrammen konnte das Molekulargewicht der Unter-einheiten der Dunaliella PFK zu 80.000 Dalton bestimmt werden (Abb. 14). Eine weitere Dissoziation der Protomere in Monomere kleiner als 80.000 wie bei der Kaninchenmuskel PFK (PAETKAU et al. 1968) war nicht zu beobachten.

Unabhängig von der elektrophoretischen Darstellung der Unter-einheiten der Dunaliella PFK wurde das Enzym bis zum Gleichgewicht gegen 6 M Guanidiniumchlorid dialysiert, um die Oligomere in einzelne Polypeptidketten zu dissoziieren. Die Analyse in der analytischen Ultrazentrifuge führte zu nur einer Sedimentationsbande mit einer Sedimentationskonstanten von 1.2S (Abb.15). Nach der Formel von TANFORD et al. (1967)

$$\frac{S}{1 - \phi \rho} = 0.286 \mu^{0.473}$$

S = Sedimentationskonstante

μ = Aggregationsgrad

ρ = Dichte des Lösungsmittels

ϕ = effektives partielles spezifisches Volumen

errechnet sich ein Molekulargewicht von 90.000 ± 10.000 für das Protomere der Dunaliella PFK. Für das effektive partielle spezifische Volumen ϕ wurde ein Wert von 0.715 ml g^{-1} angenommen, da Guanidiniumchlorid das partielle spezifische Volumen um 0.01 Einheiten reduziert (REISLER und EISENBERG 1969). Der Wert für das partielle spezifische Volumen wurde aus der Aminosäurezusammensetzung der Kaninchenmuskel PFK (PAETKAU et al. 1968) errechnet.

1.3.7. Zusammenfassung der physikalisch chemischen Parameter der Dunaliella PFK

Zusammenfassend ergibt sich aus den Daten der SDS Polyacrylamid-gelelektrophorese und der analytischen Ultrazentrifugation in 6 M Guanidiniumchlorid, daß das aktive Dunaliella PFK Molekül ein oligomeres Protein ist. Vier Protomere mit einem Molekulargewicht von 80.000 - 90.000, die, wie aus den Untersuchungen hervorgeht, identisch sind, bilden das tetramere Molekül mit einem Molekulargewicht von 320.000 - 380.000 Dalton.



Abb. 13. SDS Polyacrylamidgelelektrophorese in einem 8 %igen Gel. Proteinkonzentration: 50 μg pro Gel.

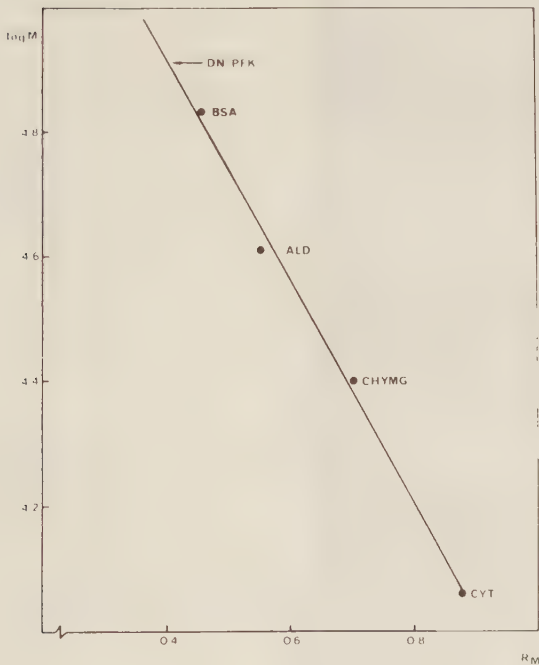


Abb. 14. Kalibriertes SDS-Elektropherogramm mit 8 %igen Polyacrylamidgelen. Eichproteine: BSA (Rinderserumalbumin 60.000), ALD (Aldolase 40.000), CHYM. (Chymotrypsinogen 25.000) und CYT (Cytochrom c 12.500) je 50 μg pro Gel.

Ordinate: Logarithmen der Molekulargewichte

Abszisse: R_M = relative Mobilität

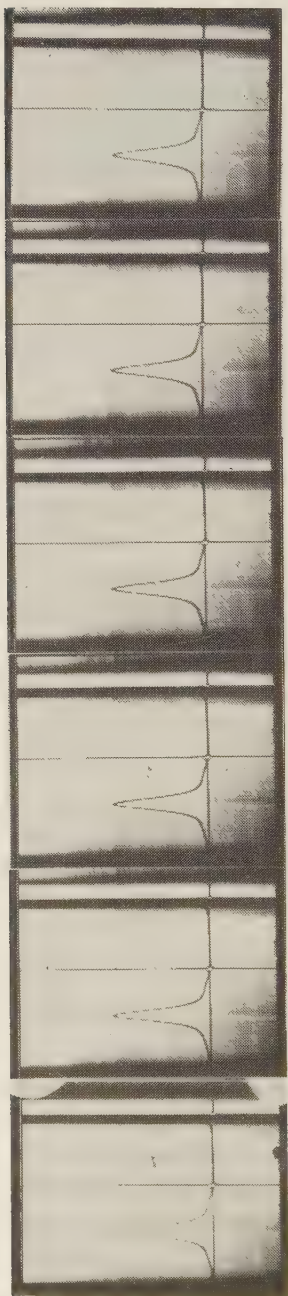


Abb. 15. Sedimentation dissoziierter *Dunaliella* PFK in der analytischen Ultrazentrifuge in einer synthetischen Grenzschiehtzelle. Nach Erreichen der Nenndrehzahl von 45.000 U/min erfolgten die Aufnahmen im Abstand von 15 min. Sedimentationsrichtung von links nach rechts. Puffer: 0.2 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7.8, 6 M Guanidiniumchlorid
Proteinkonzentration: 10 mg/ml

1.4. Molekulare Parameter der Dunaliella PFK

Nach Kenntnis der physikochemischen Daten d.h., Anzahl und Molekulargewicht der am Aufbau des aktiven Moleküls involvierten Untereinheiten, sind die Abmessungen des nativen Dunaliella PFK Moleküls zu klären.

1.4.1. Stokes'scher Radius

Die mit den Eichproteinen (Urease, Katalase, Aldolase und Rinderserumalbumin) mit definiertem Stokes'schen Radius kalibrierte Agarose Säule wurde nach der von LAURENT und KILLANDER 1964 angegebenen Formel

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

K_{av} = Verteilungskoeffizient

V_e = Elutionsvolumen im Proteinmaximum

V_o = Ausschlußvolumen der Säule 33 ml

V_t = Gesamtvolumen der Säule 112 ml

ausgewertet.

Trägt man den negativen Logarithmus $(-\log K_{av})^{1/2}$ gegen den Stokes'schen Radius der Eichproteine auf, so resultiert eine Gerade, aus der nach dem Elutionsvolumen eines unbekannten Proteins der Stokes'sche Radius abgelesen werden kann (Abb. 16).

Berechnet man K_{av} nach der oben angegebenen Formel für die einzelnen Proteinmaxima der Dunaliella PFK aus Abb. 3, so ergeben sich die Radien der entsprechenden Molekülformen.

Die Berechnung des Stokes'schen Radius für das im Ausschlußvolumen erscheinende Protein (M_I) erfolgte nach der für ein sphärisches Teilchen allgemeingültigen Formel

$$r_o = \left(\frac{3 \bar{v} \cdot M}{4 \pi \cdot N_L} \right)^{1/3}$$

r_o = Stokes'scher Radius

$\bar{v}$ = partielles spezifisches Volumen

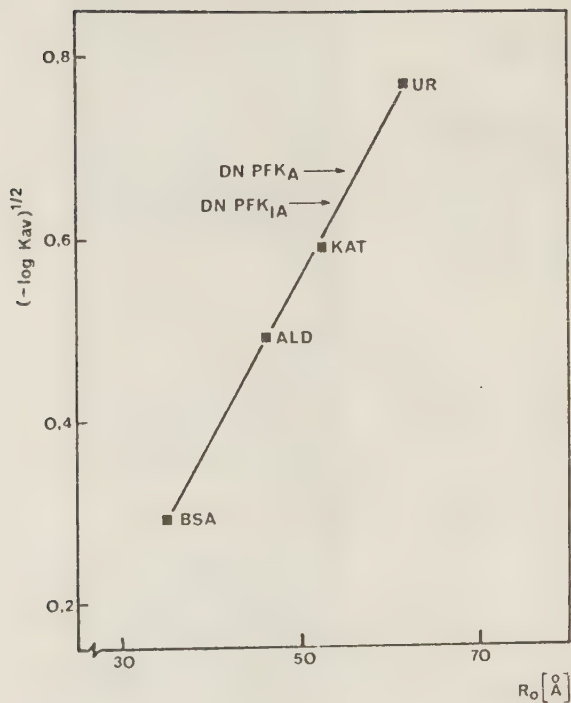


Abb. 16. Bestimmung der Stokes'schen Radien der Dunaliella PFK auf einer Agarose Säule (Bio Gel A 1.5 m). Eichproteine: UR (Urease), KAT (Katalase), ALD (Aldolase) und BSA (Pinderserumalbumin) je 1 mg/ml. Der Stokes'sche Radius (R_0) ist in Ångström (Å) angegeben.

DN PFK_A: biologisch aktive Dunaliella PFK

DN PFK_{I A}: inaktive Dunaliella PFK

N_L = Loschmidtsche Zahl

M = Molekulargewicht

Das Molekulargewicht der Proteine in M_I wurde mit 2×10^6 Dalton (1.5×10^6 Dalton obere Trenngrenze von Agarose Bio Gel A 1.5m); der Reibungskoeffizient mit 1.8 angenommen.

Aus den vorliegenden Meßdaten ergeben sich folgende molekulare Parameter für die Dunaliella PFK (Tab. 5).

1.4.2. Berechnung der theoretischen Sedimentationskonstante

Betrachtet man das Dunaliella PFK Molekül als ein kugelförmiges Molekül, so lassen sich aufgrund der Daten in Tab. 5 weitere molekulare Konstanten entwickeln.

Da die Sedimentationskonstante nach der Formel

$$S = \frac{M_{w,app} (1 - \bar{v}\rho)}{N_L \cdot f}$$

(Symbole siehe Seite 33)

vom Molekulargewicht M und dem Partikelreibungskoeffizienten f bestimmt wird, läßt sich bei Kenntnis mindestens zwei unabhängig bestimmter Daten der theoretische Sedimentationswert berechnen. Diese Bedingungen sind insofern erfüllt, da die Molekulargewichte elektrophoretisch, der Stokes'sche Radius gel-chromatographisch bestimmt wurden. Da f durch die Beziehung

$$f = 6 \pi \eta r_0$$

f = Partikelreibungskoeffizient

η = Viskosität des Lösungsmittels

r_0 = Stokes'scher Radius

gegeben ist, läßt sich der theoretische Sedimentationswert nach der Formel

$$S_{th} = \frac{M (1 - \bar{v}\rho)}{N_L \cdot 6 \pi \eta r_0}$$

M = Molekulargewicht

ρ = Dichte des Lösungsmittels

Tab. 5. Zuordnung der Stokes'schen Radien für die Molekulargewichte der einzelnen Teilchenformen der *Dunaliella salina* Phosphofruktokinase

Teilchenform	MWx10 ⁵	r ₀ Å
Aggregat	> 20	> 150 ⁺
Tetramer aktiv	3.8	56
Tetramer inaktiv	3.2	54
Dimer	2.0	40
Monomer	0.8	28 ⁺

⁺ berechnet aus den Daten der Polyacrylamidgelelektrophorese

MW = Molekulargewicht

berechnen.

Die theoretische Sedimentationskonstante der Dunaliella PFK beträgt nach der oben angegebenen Formel 12.4S bei einem Molekulargewicht von 320.000. Legt man für das aktive Molekül ein Molekulargewicht von 380.000 zugrunde, so ergibt sich ein theoretischer Sedimentationswert von 14.0S.

1.4.3. Berechnung des theoretischen Diffusionskoeffizienten

Die Diffusion eines Teilchens ist seiner Wärmeenergie direkt proportional. Während der translatorischen Bewegung muß das Teilchen den Widerstand des Lösungsmittels, die Viskosität η , überwinden. Bewegt sich ein kugelförmiges Teilchen mit dem Radius r_0 und der Geschwindigkeit v in einem Medium mit der Viskosität η , so beträgt die der Bewegung entgegengesetzte Kraft $6\pi\eta r_0 v$. Der Reibungskoeffizient ist demnach $6\pi\eta r_0$. Für eine sphärische Teilchenform läßt sich der Diffusionskoeffizient wie folgt formulieren

$$D = k \cdot T/f$$

D = Diffusionskoeffizient

k = Boltzmann Konstante

T = absolute Temperatur

f = Partikelreibungskoeffizient

Da f , wie oben gezeigt, eine Funktion von r_0 ist, ist somit der Diffusionskoeffizient abhängig von der Molekülform.

Für den Diffusionskoeffizienten einer Kugel gilt aber

$$D_{\text{Kugel}} = k \cdot T / 6\pi\eta r_0$$

η = Viskosität des Lösungsmittels

r_0 = Stokes'scher Radius

die anderen Größen siehe oben

Betrachtet man das tetramere PFK Molekül aus Dunaliella salina mit einem Molekulargewicht von 320.000 und dem Stokes'schen Radius von 54 Å als Kugel, so errechnet sich ein Diffusionskoeffizient von $3.40 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1}$.

1.4.4. Berechnung des durchschnittlichen Streumassenradius

Für die Berechnung des Streumassenradius des tetrameren PFK Moleküls wurde die Beziehung

$$R_g = (3/5)^{1/2} \cdot kT / 6\pi\eta \cdot D$$

k = Boltzmann Konstante

T = absolute Temperatur

η = Viskosität des Lösungsmittels

D = Diffusionskoeffizient

unter Benutzung des oben errechneten Diffusionskoeffizienten verwendet. R_g berechnet sich aus dieser Gleichung zu 42 Å. Dieser Wert entspricht dem mit Kleinwinkelstreuung gemessenen Massenradius der Kaninchenmuskel PFK von 51.5 Å (PARADIES und VETTERMANN 1976). Dieser Wert beinhaltet, daß es sich bei der Dunaliella PFK um ein sphärisches Molekül mit einheitlicher Elektronendichte handeln muß.

1.4.5. Berechnung der Achsenverhältnisse :

Bei der bisherigen Betrachtung der Dunaliella PFK wurde von einem kugelförmigen Molekül ausgegangen. Da aufgrund der Oberflächenladung eines Proteins Wechselwirkungen mit dem Lösungsmittel zu erwarten sind, ist diese Betrachtungsweise stark idealisiert. Löst man beispielsweise 1 g eines Proteins in Wasser, so beträgt die Volumenzunahme nicht wie man bei einer Dichte von 1.27 gcm^{-3} erwarten sollte 0.78 cm^3 , sondern nur 0.75 cm^3 oder weniger. Dieser Wert erklärt sich aus der Immobilisierung von Wassermolekülen, die aufgrund der Wechselwirkungen Protein - Lösungsmittel gebunden werden und die Molekülform beeinflussen können (BEIER 1965).

Da die Sedimentationskonstante ebenfalls von der Molekülform abhängig ist, führt ein Vergleich des theoretischen und gemessenen Sedimentationskoeffizienten nach der Beziehung

$$f/f_0 = \frac{s_{\text{app.}}}{s_{\text{theor.}}}$$

f = Reibungskoeffizient des hydratisierten Moleküls

f_o = Reibungskoeffizient des wasserfreien Moleküls

zur Ermittlung des Achsenverhältnisses.

Bildet man für das tetramere PFK Molekül den Quotienten $S_{app}/S_{theor.}$, so resultiert ein Wert von 1.45. Nach den von PERRIN (1935) tabellierten Werten ergibt sich für ein längliches Rotationsellipsoid ein Achsenverhältnis von 1 : 8.

2.1. Kinetik der Dunaliella salina PFK

Nach Darstellung der molekularen Struktur der Dunaliella salina PFK wird im folgenden das kinetische Verhalten untersucht und der Reaktionsmechanismus des Enzyms entwickelt.

Abb. 17 zeigt einen typischen Reaktionsverlauf, gemessen als Oxydation von $NADH+H^+$ zu NAD^+ , unter optimalen Reaktionsbedingungen (Substratkonzentration, Temperatur, Ionenstärke, Wasserstoffionenkonzentration). Charakteristisch ist die Verzögerungsphase am Anfang der Reaktion, die auf eine positive Kooperativität des Enzyms hinweist (KOSHLAND und NEET 1968). Für die Auswertung der kinetischen Messungen wurde das ΔE_{340} im linearen Bereich der Reaktionskurve bestimmt.

Aus der Geschwindigkeitsgleichung

$$v = \frac{k_2 E_t \cdot C_S}{K_m + C_S}$$

$$v = \frac{k_2 E_t}{\frac{K_m}{C_S} + 1}$$

$$v_{max} = \lim_{C_S \rightarrow \infty} v = k_2 E_t$$

v = Reaktionsgeschwindigkeit

E_t = Gesamtenzymkonzentration

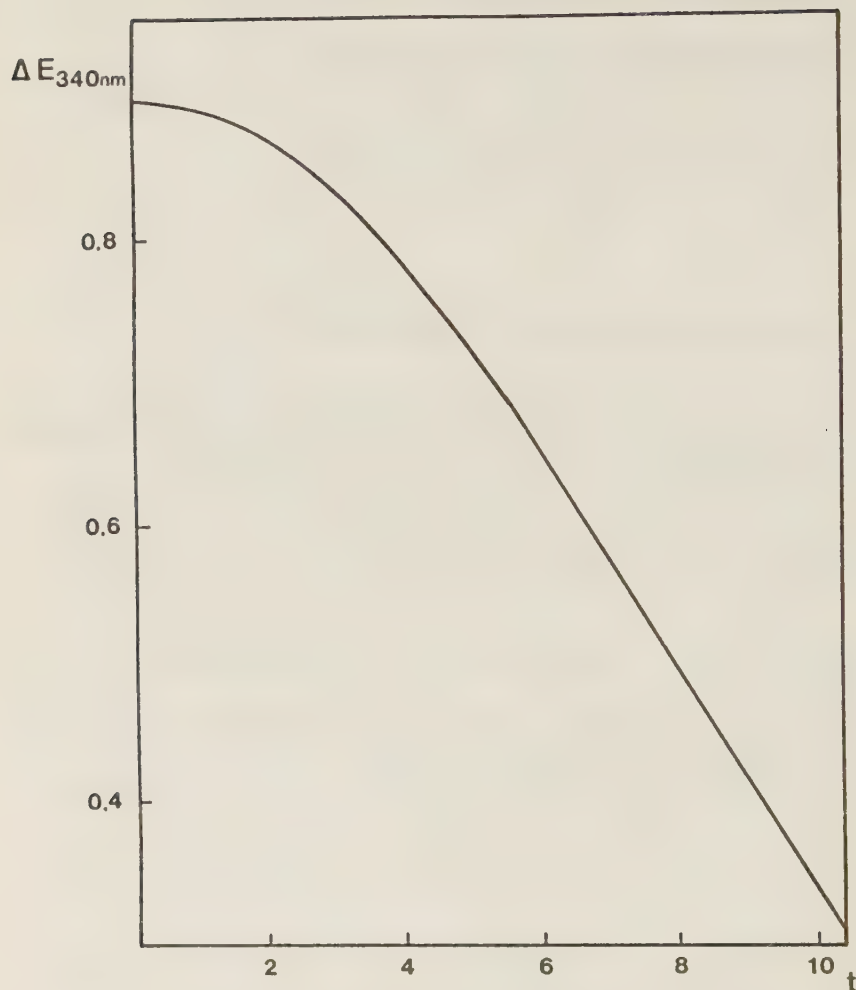


Abb. 17. Typischer Reaktionsverlauf der *Dunaliella* PFK gemessen als Oxydation von $NADH + H^+$ zu NAD^+ . Enzymkonzentration im Standardtestansatz 15 μg . Zeitangabe (t) in Minuten.

C_S = Substratkonzentration

K_m = Michaelis Konstante

k_2 = Zerfallskonstante des Enzymsubstratkomplexes

einer enzymatisch katalysierten Reaktion geht hervor, daß bei unendlicher Substratkonzentration $v = V_{\max}$ ist. Nach der oben angegebenen Gleichung ist $V_{\max}$ nur abhängig von der eingesetzten Enzymkonzentration $V_{\max} = k_2 E_t$.

Wie in Abb. 18 dargestellt, ist die Bedingung der Linearität zwischen Reaktionsgeschwindigkeit und der eingesetzten Enzymkonzentration in dem gewählten Bereich erfüllt.

2.1.1. pH Abhängigkeit

Die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der Dunaliella PFK von der Wasserstoffionenkonzentration wurde in einem pH Bereich von pH 5.5 - 9.1 unter optimalen Bedingungen gemessen. Die einzelnen Ansätze wurden vor und nach der Reaktion elektrochemisch auf ihren pH Wert überprüft.

Wie aus Abb. 19 hervorgeht, folgt die pH Kurve nicht einer idealen Glockenkurve. Die Aktivitätsabnahme im sauren pH Bereich (pH 7 - 6) ist wesentlich stärker als der Abfall im alkalischen Bereich. Der steile Aktivitätsabfall im sauren Bereich ist auf die Dissoziation des aktiven PFK Moleküls in die dimere Form zurückzuführen (MANSOUR 1965). Die Reduktion der Aktivität im alkalischen Bereich, die wesentlich langsamer verläuft, kann auf eine Deprotonierung im katalytischen Bereich des Enzyms zurückgeführt werden. Die im Bereich von pH 7.5 - 6.2 ablaufenden Veränderungen sind reversibel, wie Titrationsexperimente gezeigt haben.

Aufgrund des aktiven Bereichs können Histidinreste als mögliche Bindungsstellen für die Substrate in Frage kommen (SETLOW und MANSOUR 1970).

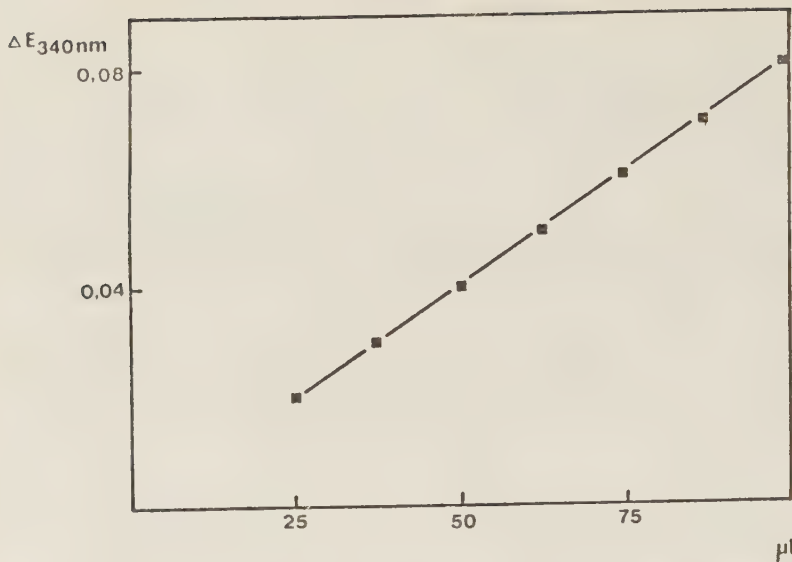


Abb. 18. Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der eingesetzten Dunaliella PFK Konzentration. Die Reaktionsgeschwindigkeit wurde mit dem Standardtestansatz gemessen. 100 μ l entsprechen 40 μ g Protein.

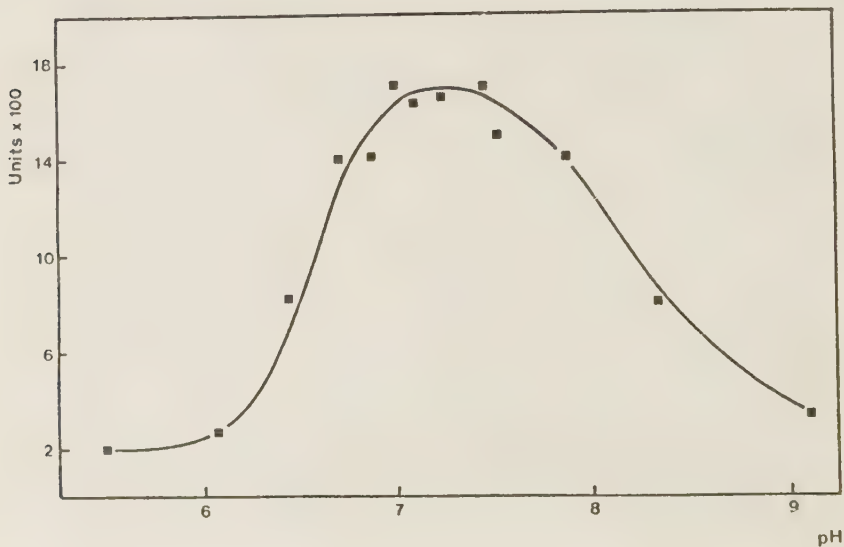


Abb. 19. Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der *Dunaliella salina* PFK von der Wasserstoffionenkonzentration. Die Aktivität wurde mit dem Standardtestansatz gemessen. Eine Unit entspricht 0.81 μ M F-1.6-P/min

2.1.2. Temperaturabhängigkeit

Die Betrachtung der Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Temperatur erlaubt Aussagen über die Veränderung der thermodynamischen Parameter zwischen Reaktant, Enzym-Substrat-Komplex und Produkt.

Trägt man nach Arrhenius den Logarithmus der Reaktionsgeschwindigkeit v gegen den reziproken Wert der absoluten Temperatur auf, so resultiert eine Gerade, wenn die Reaktion von nur einem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt über den beobachteten Bereich abhängig ist.

In Abb. 20 ist die Reaktionsgeschwindigkeit der Dunaliella PFK in Abhängigkeit von der Temperatur dargestellt. Der bei einer Temperatur von 10°C auftretende Knick der Geraden deutet auf zwei die Reaktionsgeschwindigkeit beeinflussende Faktoren hin. Möglicherweise liegen unterhalb von 10°C aktive und inaktive Formen der Dunaliella PFK vor, oder es existieren verschiedene Konformationszustände unterschiedlicher Aktivität bei den Temperaturen ober- und unterhalb der 10°C Schwelle.

Bei Temperaturen oberhalb von 10°C errechnet sich aus der graphischen Darstellung Abb. 20 eine Aktivierungsenergie für die Dunaliella PFK von -15.9 kcal/Mol , während unterhalb dieser Temperatur die Aktivierungsenergie -5.88 kcal/Mol beträgt. Das Temperaturoptimum der Dunaliella PFK liegt bei 25°C .

2.2. Bestimmung der Michaelis Konstanten

Die Bestimmung der Michaelis Konstanten K_m für die Substrate ATP und F-6-P wurde nach der Geschwindigkeitsgleichung von ALBERTY (1953)

$$v = \frac{V_C A C_B}{K_{AB} + K_m^A C_B + K_m^B C_A + C_A C_B}$$

v = Reaktionsgeschwindigkeit

V = Maximale Reaktionsgeschwindigkeit

C_A = Konzentration des Substrats A

C_B = Konzentration des Substrats B

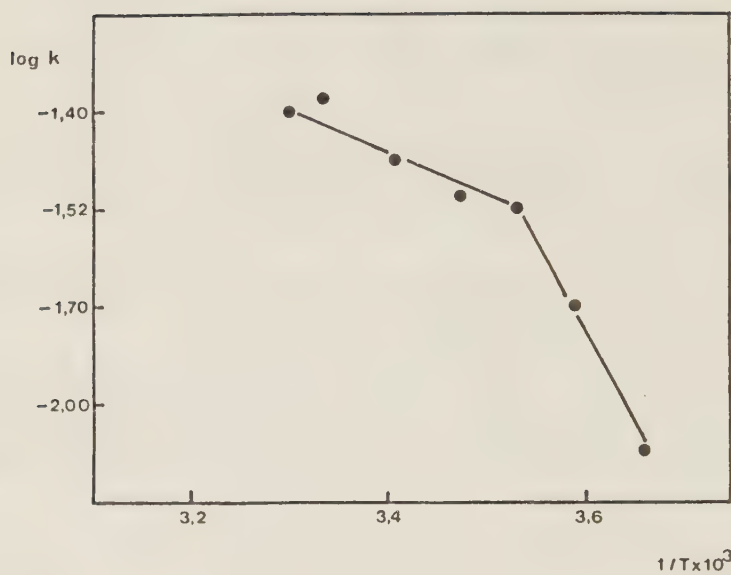


Abb. 20. Bestimmung der Aktivierungsenergie nach Arrhenius
für *Dunaliella salina* PFK

K_m^A = Michaeliskonstante für das Substrat A

K_m^B = Michaeliskonstante für das Substrat B

K_{AB} = Proportionalitätskonstante (ALBERTY 1953)

durchgeführt. Diese Gleichung beschreibt die Reaktionsgeschwindigkeit eines sequentiellen Reaktionsmechanismus in Abhängigkeit von zwei Substraten. Unter der Voraussetzung, daß z.B. $C_B \gg K_{AB}$ ist, reduziert sich die oben angegebene Geschwindigkeitsgleichung auf eine Einsubstratreaktion der Form

$$v = \frac{VC_A}{K_m^A + C_A}$$

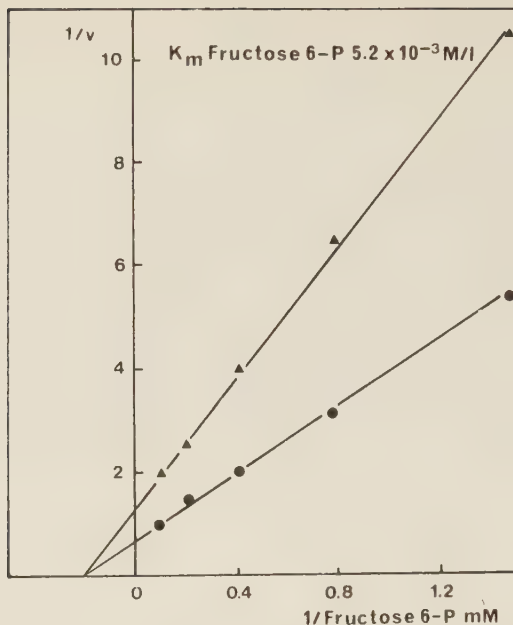
Aus dieser Gleichung läßt sich die jeweilige Michaelis Konstante für die beiden an der Reaktion beteiligten Substrate getrennt bestimmen.

Unter den gewählten experimentellen Bedingungen folgt die Reaktion der Dunaliella PFK der normalen Michaelis Menten Kinetik. Die graphische Darstellung der Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit der jeweiligen Substratkonzentrationen in der doppelt reziproken Form nach LINEWEAVER und BURK (1934) ergeben Geraden, deren Schnittpunkte mit der Abszisse die reziproken K_m Werte angeben.

Abb. 21 zeigt die Bestimmung der Michaelis Menten Konstante für F-6-P in Gegenwart von 0.66 mM und 0.066 mM ATP. Für F-6-P ergibt sich ein K_m Wert von 5.2×10^{-3} M/l, der verglichen mit PFK Präparationen aus tierischen Organismen relativ hoch erscheint (UYEDA und RACKER 1965). In Übereinstimmung zu pflanzlichen PFK Präparationen ist dieser K_m Wert jedoch recht gut (DENNIS und COULTATE 1967).

Die Michaelis Menten Konstante für ATP ergibt sich aus der Lineweaver Burk Darstellung zu 1.16×10^{-4} M/l bei einer F-6-P Konzentration von 10 mM und 2.5 mM. Dieser Wert ist vergleichbar mit den Daten anderer Autoren (BRAND und SÖLING 1974 und DENNIS und COULTATE 1967).

a)



b)

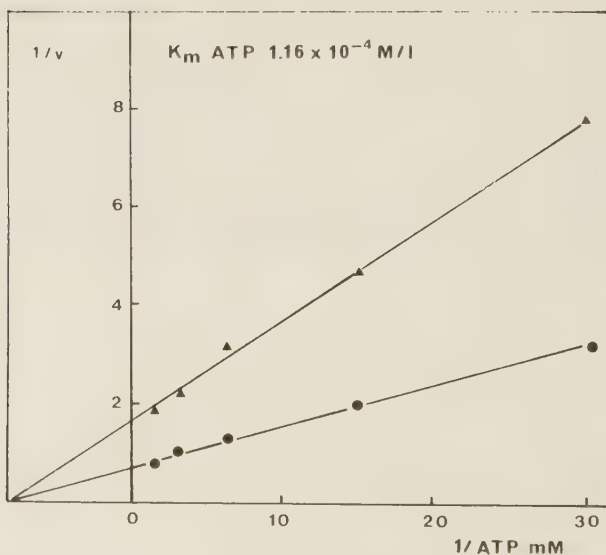


Abb. 21.

a) Bestimmung von K_m F-6-P bei einer ATP Konzentration von (●) 0.66 mM und (▲) 0.066 mM .

b) Bestimmung von K_m ATP bei einer F-6-P Konzentration von (●) 10.0 mM und (▲) 2.5 mM . $1/v$ ist in $(10^{-2} \mu\text{mol/min})^{-1}$ angegeben. Die Bestimmung erfolgte mit dem Standardtestansatz.

2.3. Untersuchungen zur Aufklärung des Dunaliella PFK Reaktionsmechanismus

In der vorliegenden Arbeit soll aus der Produkthemmung der Hinreaktion der Reaktionsmechanismus der Dunaliella PFK entwickelt werden.

Aufgrund kinetischer Messungen soll die Reihenfolge der Bindung der Substrate und ihre Freisetzung nach der Katalyse untersucht werden. Wie aus den Untersuchungen von Cleland hervorgeht, sind mehrere Reaktionstypen für eine Zweisubstratreaktion möglich (CLELAND 1963). Liegt bei der Dunaliella PFK ein geordneter oder ungeordneter sequentieller Mechanismus vor, oder handelt es sich um einen Ping Pong Mechanismus im Sinne der Cleland Nomenklatur?

Erschwert wird die Frage nach dem Reaktionsmechanismus dadurch, daß die Konzentrationen der Substrate den Mechanismus entscheidend beeinflussen können (UYEDA 1972 und KEE und GRIFFIN 1972). Isotopenaustausch und Bindungsstudien sollten für weitergehende Experimente unerlässlich sein, um eine eindeutige Aussage über den Reaktionsmechanismus zu machen.

2.4. Endprodukthemmung

Bei der Produkthemmung wird die Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit verschiedener konstanter Konzentrationen der Reaktionsprodukte (ADP und F-1.6-P) untersucht und mit der Reaktionsgeschwindigkeit der nichtgehemmten Reaktion (Inhibitorkonzentration null) verglichen. Aus der Auftragung nach Lineweaver und Burk lassen sich die verschiedenen Hemmtypen (kompetitiv, unkompetitiv und nichtkompetitiv) ablesen, die nach der Cleland Nomenklatur ausgewertet, Aussagen über den Reaktionsmechanismus unter den gewählten experimentellen Bedingungen gestatten.

Untersucht man den Einfluß von ADP auf die Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der ATP Konzentration bei gesättigter, 10 mM, (Abb. 22a) und nichtgesättigter F-6-P, 2.6 mM, (Abb. 22b), Konzentration, so ergibt sich in beiden Fällen eine nichtkompetitive Hemmung. Charakteristisch für diesen Hemmtyp ist,

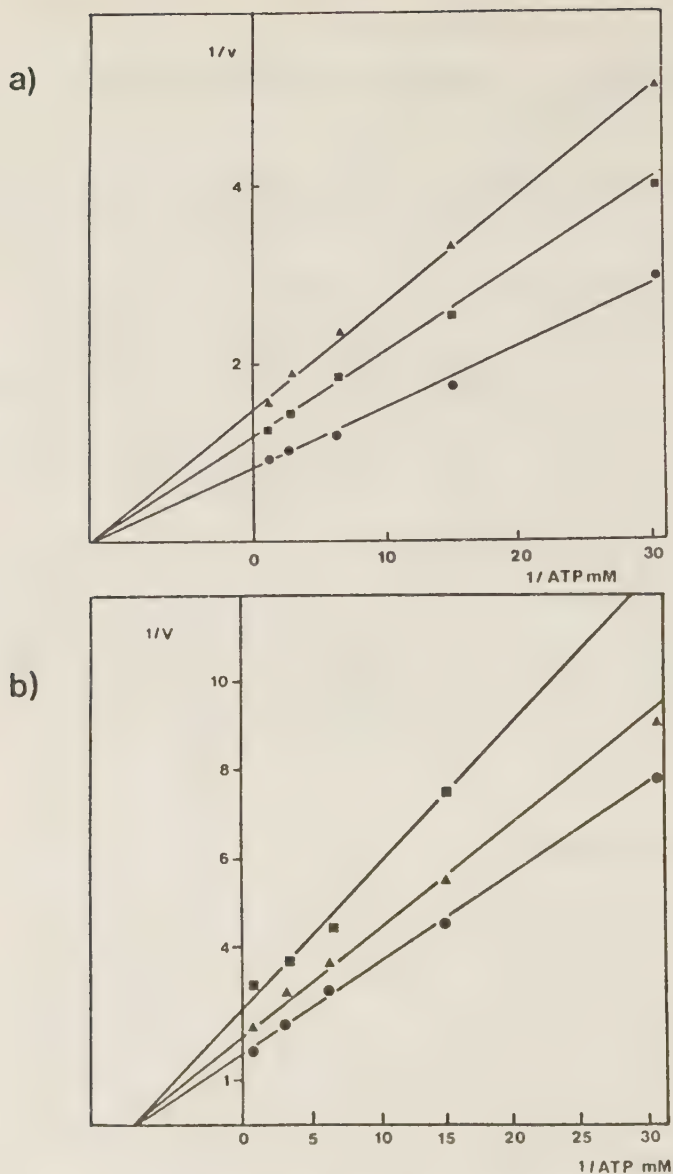


Abb. 22.

a) Hemmung von ADP gegenüber ATP bei gesättigter F-6-P Konzentration (10 mM). (●) kein ADP, (■) 3.4 mM ADP, (▲) 6.7 mM ADP.

b) Hemmung von ADP gegenüber ATP bei nicht gesättigter F-6-P Konzentration (2.6 mM). $1/v$ ist in $(10^{-2} \mu\text{mol/min})^{-1}$ angegeben. (●) kein ADP, (▲) 3.4 mM ADP, (■) 6.7 mM ADP. $1/v$ ist in $(10^{-3} \mu\text{mol/min})^{-1}$ angegeben. Testansatz wie in Abb. 21

daß sowohl das Enzym als auch der Enzymsubstratkomplex mit dem Inhibitor (ADP) nach dem Schema



E = Enzym

S = Substrat

I = Inhibitor

P = Produkt

reagiert, und es zur Bildung inaktiver Enzymkomplexe kommt (GUTFREUND 1972).

Aus der Geschwindigkeitsgleichung

$$v = \frac{\frac{V}{1 + \frac{C_I}{K_I}} \cdot C_S}{K_m + C_S}$$

v = Reaktionsgeschwindigkeit

V = maximale Reaktionsgeschwindigkeit

C_I = Inhibitorkonzentration

C_S = Substratkonzentration

K_m = Michaelis Konstante

K_I = Inhibitorkonstante

einer nichtkompetitiv gehemmten Reaktion geht hervor, daß bei steigenden Inhibitorkonzentrationen V_{max} reduziert wird, während K_m unverändert bleibt.

Variiert man die F-6-P Konzentration bei gesättigter (0.66 mM) ATP Konzentration, so ergibt sich eine unkompetitive Hemmung (Abb. 23 a). Dieser Hemmtyp ist dadurch charakterisiert, daß der Inhibitor (ADP) nur mit dem Enzymsubstratkomplex nach folgendem Schema reagiert (GUTFREUND 1972)



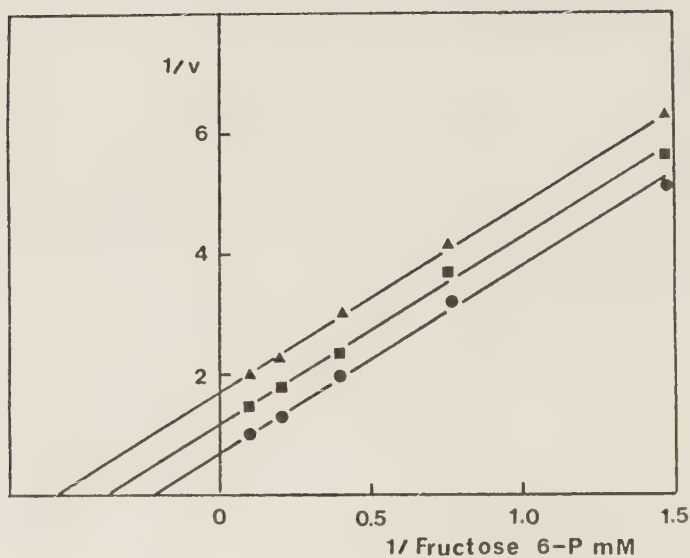


Abb. 23 a. Hemmung von ADP gegenüber F-6-P bei gesättigter ATP Konzentration (0.66 mM). (●) kein ADP, (■) 3.4 mM ADP, (▲) 6.7 mM ADP. $1/v$ ist in $(10^{-2} \mu\text{mol/min})^{-1}$ angegeben. Testansatz wie in Abb. 21.

Aus der Geschwindigkeitsgleichung

$$v = \frac{\frac{V}{1 + \frac{C_I}{K_I}} \cdot C_S}{\frac{K}{1 + \frac{C_I}{K_I}} + C_S}$$

dieses Hemmtyps geht hervor, daß $V_{\max}$ und K_m um den Betrag $(1 + \frac{C_I}{K_I})^{-1}$ reduziert wird d.h., in der Lineweaver Burk Darstellung ergeben sich parallele Geraden.

Bei nicht gesättigter ATP Konzentration (0.33 mM) ergibt sich eine nichtkompetitive Hemmung in Gegenwart von ADP als Inhibitor bei variablen F-6-P Konzentrationen (Abb. 23 b).

Um den Einfluß von F-1.6-P auf die Reaktionsgeschwindigkeit zu bestimmen, wurde der Pyruvatkinase Testansatz verwendet.

Variiert man die ATP Konzentration in Gegenwart konstanter Konzentrationen des Inhibitors F-1.6-P bei gesättigter F-6-P Konzentration (10 mM), so läßt sich bei keiner der gewählten Inhibitorkonzentrationen eine Hemmung der Reaktionsgeschwindigkeit nachweisen (Abb. 24 a). Bei nicht gesättigter F-6-P Konzentration (2.6 mM) ergibt sich eine nicht kompetitive Hemmung. Dieser hier auftretende Hemmtyp unterscheidet sich von der vorausgegangenen insofern, daß sich die Geraden in der doppelt reziproken Darstellung nicht auf, sondern oberhalb der Abszisse schneiden (Abb. 24 b). Im Gegensatz zu der reinen nichtkompetitiven Hemmung wie in Abb. 22 a,b und 23 b liegt hier eine gemischt nichtkompetitive Hemmung vor, bei der Michaelis Konstante, Maximalgeschwindigkeit und das Verhältnis zwischen beiden durch die Inhibitorkonzentration beeinflußt werden (DIXON und WEBB 1958).

Variiert man die F-6-P Konzentration in Gegenwart konstanter Konzentrationen des Inhibitors F-1.6-P bei gesättigten (0.66 mM, Abb. 25 a) und nicht gesättigten (0.33 mM, Abb. 25b) ATP Konzentrationen, so ist in beiden Fällen eine kompetitive Hemmung zu beobachten. Dieser Hemmtyp läßt sich schematisch wie folgt formulieren (GUTFREUND 1972)

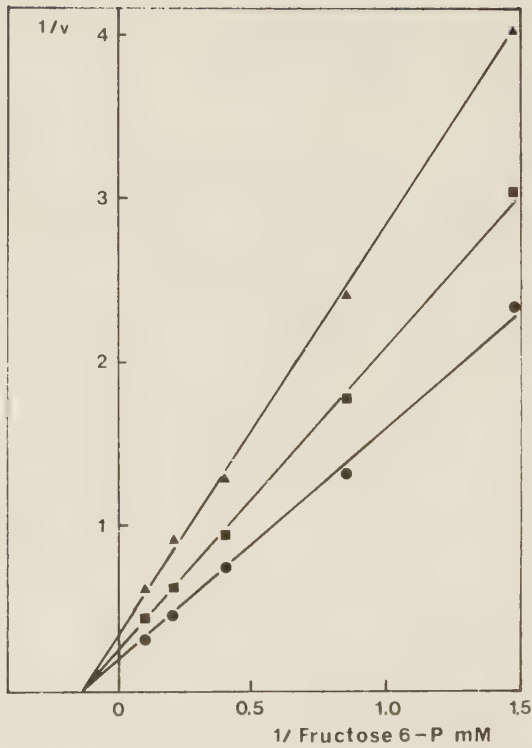
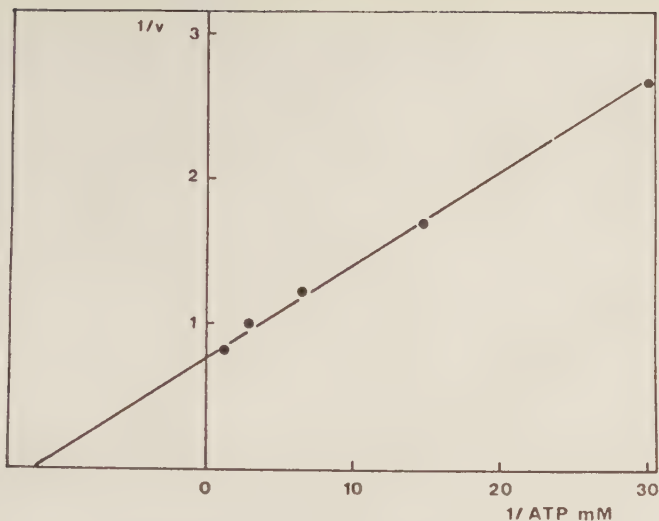


Abb. 23 b. Hemmung von ADP gegenüber F-6-P bei nicht gesättigter ATP Konzentration (0.33 mM). (●) kein ADP, (■) 3.4 mM ADP, (▲) 6.7 mM ADP. $1/v$ ist in $(10^{-2} \mu\text{mol/min})^{-1}$ angegeben. Testansatz wie in Abb. 21.

a)



b)

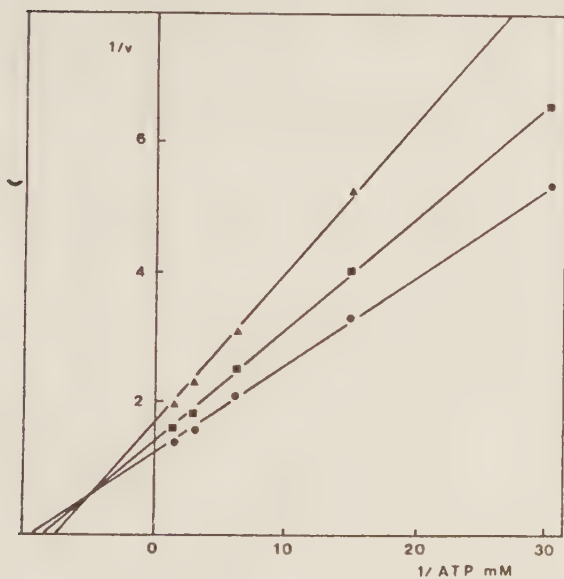
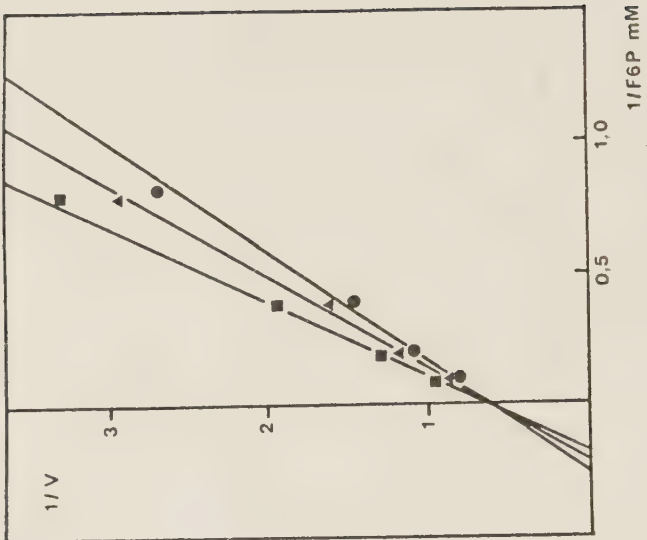


Abb. 24.

a) Hemmung von F-1.6-P gegenüber ATP bei gesättigter F-6-P Konzentration (10 mM). Für diese Untersuchungen wurde der Pyruvatkinase Testansatz verwendet. Bei 3.5 mM und 7.2 mM F-1.6-P war keine Hemmung zu beobachten.

b) Hemmung von F-1.6-P gegenüber ATP bei nicht gesättigter F-6-P Konzentration (2.6 mM). (●) kein F-1.6-P, (■) 3.5 mM F-1.6-P, (▲) 7.2 mM F-1.6-P. $1/v$ ist in $10^{-2} \text{ min}^{-1} \text{ (mg protein)}^{-1}$

b)



a)

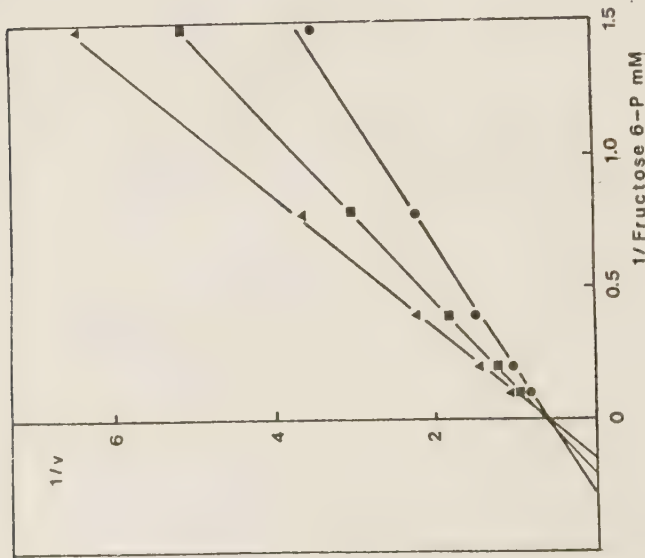


Abb. 25.

a) Hemmung von F-1.6-P gegenüber F-6-P bei gesättigter ATP Konzentration (0.66 mM).
(●) kein F-1.6-P, (■) 3.6 mM F-1.6-P, (▲) 7.2 mM F-1.6-P.

b) Hemmung von F-1.6-P gegenüber F-6-P bei nicht gesättigter ATP Konzentration (0.33 mM).
(●) kein F-1.6-P, (▲) 3.6 mM F-1.6-P, (■) 7.2 mM F-1.6-P. $1/v$ ist in $(10^{-2} \mu\text{mol/min})^{-1}$ angegeben. Testansatz wie in Abb. 24.



Aus der Geschwindigkeitsgleichung

$$v = \frac{V \cdot C_S}{K_m (1 + C_I/K_I) + C_S}$$

folgt, daß bei unendlichen Substratkonzentrationen $V_{\max}$ unverändert, die K_m Werte jedoch durch den Faktor $(1 + C_I/K_I)$ beeinflusst werden. In der Lineweaver Burk Darstellung schneiden sich die Geraden auf der Ordinate in einem Punkt.

In Tab. 6 sind die Ergebnisse der Produkthemmung schematisch zusammengefaßt. Daraus ergibt sich, daß F-1.6-P ein kompetitiver Inhibitor gegen F-6-P sowohl bei gesättigter als auch nicht gesättigter ATP Konzentration ist. Inhibitor und Substrat konkurrieren also um die gleiche Bindungsstelle am aktiven Zentrum des Enzyms.

ADP ist ein nichtkompetitiver Inhibitor für ATP bei gesättigter und nicht gesättigter F-6-P Konzentration. Die beiden Substrate ATP und ADP reagieren also mit unterschiedlichen Zwischenstufen des Enzyms im Sinne der Cleland Nomenklatur.

ADP ist bei nicht gesättigter ATP Konzentration ein nichtkompetitiver Inhibitor gegen F-6-P d.h., die Bindung der Substrate ADP und F-6-P erfolgt an verschiedenen Zwischenstufen des Enzyms. Bei Sättigung des Enzyms mit ATP geht die nichtkompetitive in eine unkompetitive Hemmung über. Der Zerfall des zentralen Übergangskomplexes ist verzögert, so daß die Substrate ATP und ADP in der Sequenz aufeinander folgen müssen.

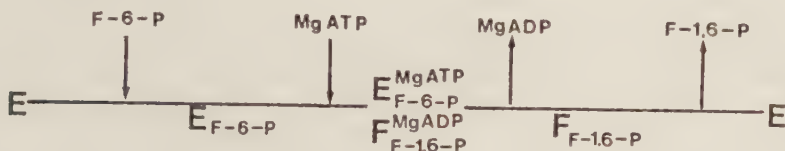
Die bei nichtgesättigter F-6-P Konzentration zu beobachtende nichtkompetitive Hemmung von F-1.6-P gegen ATP wird durch Sättigung des Enzyms mit F-6-P aufgehoben. Dieser Befund deutet ebenfalls auf verschiedene Zwischenstufen der Katalyse bezüglich F-1.6-P und ATP hin. Ist F-6-P in gesättigter Konzentration vorhanden, läuft die Sequenz von F-6-P über ATP zu einem zentralen Komplex ohne Einfluß des Inhibitors.

Aufgrund dieser Beobachtungen ergibt sich nach der Cleland Nomenklatur ein geordneter sequentieller Reaktionsmechanismus

Tab. 6. Zusammenfassung der Daten aus der Produkt Hemmung bei der Untersuchung der Kinetik der Dunaliella salina Phosphofruktokinase

Inhibitor	variiertes Substrat			
	ATP		Fruktose-6-phosphat	
	nicht gesättigt mit F6P	gesättigt mit F6P	nicht gesättigt mit ATP	gesättigt mit ATP
ADP	nichtkompetitiv	nichtkompetitiv	nichtkompetitiv	unkompetitiv
Fruktose-1.6-bisphosphat	nichtkompetitiv	keine Hemmung	kompetitiv	kompetitiv

(CLELAND 1963). Bei der *Dunaliella salina* PFK reagieren die Substrate in folgender Sequenz: Zuerst wird F-6-P und dann MgATP gebunden, Mg-ADP ist das erste, F-1.6-P das zweite Reaktionsprodukt. Schematisch stellt sich dieser Mechanismus wie folgt dar:



Die hier dargestellten Ergebnisse der Produkthemmung und des Reaktionsmechanismus sind in Übereinstimmung mit den Rattenleber PFK gemessenen Daten (BRAND und SÖLLING 1974), stehen jedoch im Widerspruch zu den Ergebnissen von HANSON et al. (1973) und BAR-TANA und CLELAND (1974), die für Kaninchenmuskel PFK einen ungeordneten sequentiellen Mechanismus angeben.

Die apparenten Hemmkonstanten K_I wurden aus den graphischen Darstellungen Abb. 22a - 25b nach den von WONG (1975) angegebenen Formeln errechnet (Tab. 7).

Kompetitive Hemmung:

$$K_I = \frac{C_I}{\frac{K_m^+}{K_m} - 1}$$

Nichtkompetitive und unkompetitive Hemmung:

$$K_I = \frac{C_I}{\frac{V_S}{V_S^+} - 1}$$

K_I = Inhibitorkonstante

C_I = Inhibitorkonzentration

K_m^+ = apparente Michaeliskonstante für das jeweilige Substrat bei konstanter Konzentration des Inhibitors

V_S^+ = apparente Maximalgeschwindigkeit für das jeweilige Substrat bei konstanter Konzentration des Inhibitors

Tab. 7. Apparente Hemmkonstanten K_I für Phosphofruktokinase
aus *Dunaliella salina*

Inhibitor	variables Substrat	konstantes Substrat	K_I
ADP	ATP	F6P gesättigt	7.6 mM
ADP	ATP	F6P ungesättigt	12.8 mM
ADP	F6P	ATP gesättigt	4.7 mM
ADP	F6P	ATP ungesättigt	9.9 mM
F1.6P	F6P	ATP gesättigt	9 mM
F1.6P	F6P	ATP ungesättigt	9.3 mM
F1.6P	ATP	F6P ungesättigt	34.4 mM

2.5. Austauschbarkeit von Nukleotidtriphosphaten an Dunaliella PFK

Die verschiedenen Purin- und Pyrimidin Nukleotidtriphosphate wurden auf ihre Austauschbarkeit als Phosphatdonatoren in äquimolaren Konzentrationen untersucht (Abb. 26).

Die Hemmung der *Dunaliella salina* PFK nimmt bei höheren ATP Konzentrationen zu. Weniger stark ausgeprägt ist die Hemmung durch die Purinderivate GTP und ITP. GTP ist als Phosphatdonator jedoch wesentlich schwächer als UTP obwohl UTP ein Pyrimidinderivat ist. CTP erwies sich als Phosphatdonator nicht geeignet.

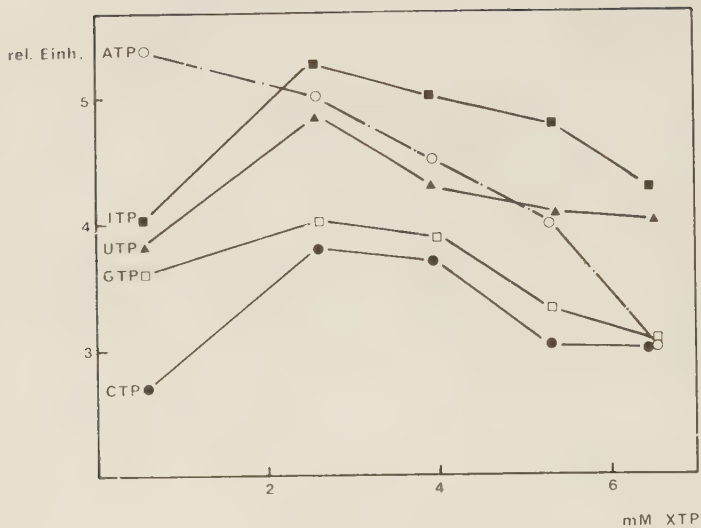
Auffallend ist die Effektivität der Phosphatdonatoren ITP und UTP, die im Bereich bereits hemmender ATP Konzentrationen optimal ist. Andererseits ist die Hemmung durch diese Nukleotidtriphosphate in höheren Konzentrationen wesentlich schwächer ausgeprägt als durch ATP.

2.6. Effektoren der Dunaliella PFK

Verschiedene Substanzen beeinflussen die Aktivität der PFK (GARLAND et al. 1963 und KELLY und TURNER 1968). Im folgenden sollen einige Effektoren auf ihre Wirksamkeit an der *Dunaliella* PFK überprüft werden.

2.6.1. Einfluß von Mg^{2+} Ionen auf die Reaktionsgeschwindigkeit

Wie für die phosphatgruppenübertragenden Enzyme angegeben, wird die Reaktion nur aus einem Metall-Nukleotidtriphosphatkomplex katalysiert (MILDVAN 1974). Eine Reduktion der Magnesiumkonzentration senkt die Reaktionsgeschwindigkeit der *Dunaliella* PFK drastisch (Abb. 27). Diese Befunde stehen im Einklang mit den Ergebnissen von PAETKAU und LARDY (1967), die den Magnesium ATP Komplex als das eigentliche Substrat für PFK angeben.



Ab.. 26. Einfluß verschiedener Nukleotidtriphosphate auf die Reaktionsgeschwindigkeit der *Dunaliella* PFK. Eine relative Einheit entspricht $0.81 \mu\text{M F-1.6-P/min}$. Die Messung erfolgte mit dem Standardtestansatz.

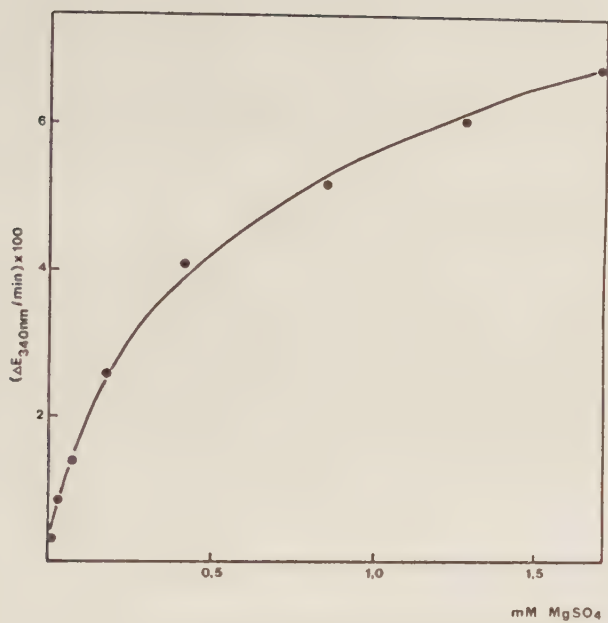


Abb. 27. Einfluß von Mg^{2+} angeboten als neutralisiertes MgSO_4 auf die Reaktionsgeschwindigkeit der Duna-liella PFK. Die Messung erfolgte mit dem Standardtest-ansatz.

2.6.2. Einfluß von Citrat auf die Reaktionsgeschwindigkeit

Die Reaktionsgeschwindigkeit der Dunaliella PFK wurde in Abhängigkeit steigender Citratkonzentrationen untersucht. Das Citrat wurde vor der Reaktion neutralisiert, der Testansatz nach Ablauf der Reaktion elektrochemisch auf seinen pH Wert überprüft, um Dissoziationen durch pH Senkungen auszuschließen. Abb. 28 zeigt, daß die Reaktionsgeschwindigkeit mit zunehmender Citratkonzentration abnimmt. Bei einer Konzentration von 13 mM Citrat ist die Hemmung bereits deutlich ausgeprägt.

2.6.3. Phosphoenolpyruvat als Effektor

Phosphoenolpyruvat beeinflusst die Reaktionsgeschwindigkeit des Enzyms stärker als Citrat (Abb. 29). Bereits 2 mM Phosphoenolpyruvat hemmen die Reaktionsgeschwindigkeit merklich. Eine Regulation des Enzyms über diese Effektoren wäre in bezug auf Glykolyse und Zitronensäurecyclus denkbar, wobei die Feinregulation über Phosphoenolpyruvat laufen könnte.

2.7. Hinweise auf das allosterische Verhalten der Dunaliella PFK

Die in Abb. 17 dargestellte Verzögerungsphase nach Starten der Reaktion unter optimalen Bedingungen wurde als Hinweis auf eine positive Kooperativität der Dunaliella PFK gedeutet. Da die Reaktion des Enzyms aus zwei Substraten katalysiert wird, war die Frage zu klären, welches der beiden Substrate (ATP oder F-6-P) für diese Kooperativität verantwortlich ist, da beide Moleküle Effektoren der PFK sind.

Zur Untersuchung der allosterischen Natur der Dunaliella PFK wurden die Reaktionsgeschwindigkeiten bei konstanten bereits hemmenden ATP Konzentrationen gegen die variierende F-6-P Konzentration aufgetragen. In dem untersuchten F-6-P Konzentrationsbereich ergaben sich sigmoide Substratumsatzkurven, die mit steigender ATP Konzentration nach rechts verschoben sind (Abb.30). Diese Befunde deuten auf eine positive Kooperativität des Dunaliella Enzyms gegenüber F-6-P hin d.h., die Reaktionsgeschwindigkeit nimmt bei geringen F-6-P Konzentrationen

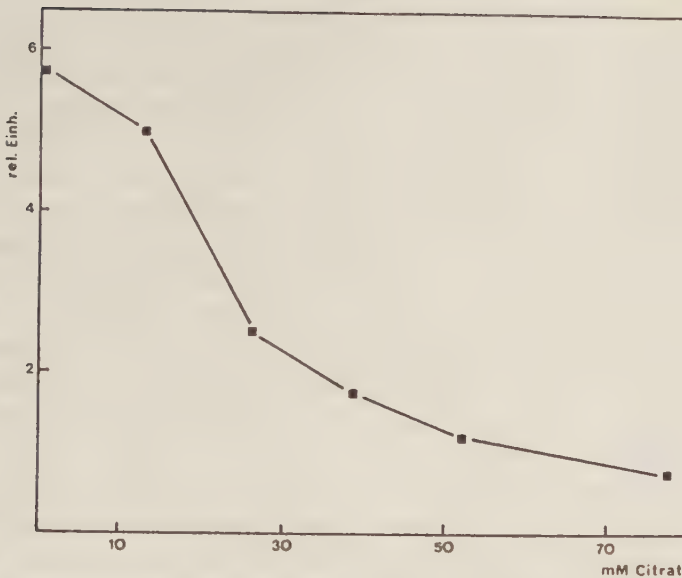


Abb. 28. Einfluß von Citrat auf die Reaktionsgeschwindigkeit der *Dunaliella* PFK. Eine relative Einheit entspricht $0.81 \mu\text{M F-1.6-P/min.}$ Die Messung erfolgte mit dem Standardtestansatz.

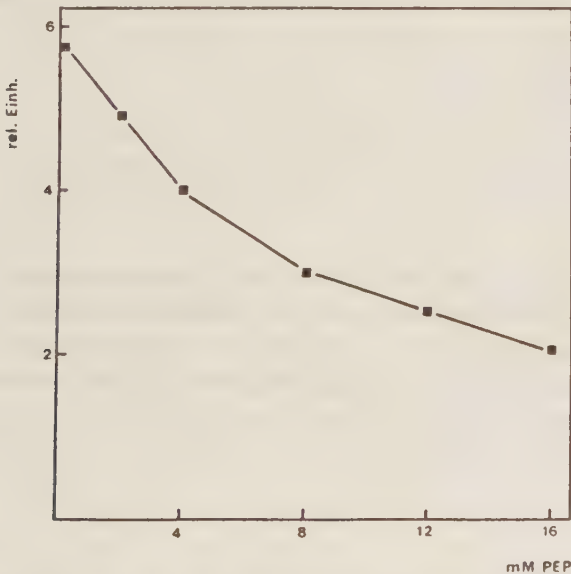


Abb. 29. Einfluß von Phosphoenolpyruvat (PEP) auf die Reaktionsgeschwindigkeit der *Dunaliella* PFK. Eine relative Einheit entspricht $0.81 \mu\text{M F-1.6-P/min.}$ Die Messung erfolgte mit dem Standardtestansatz.

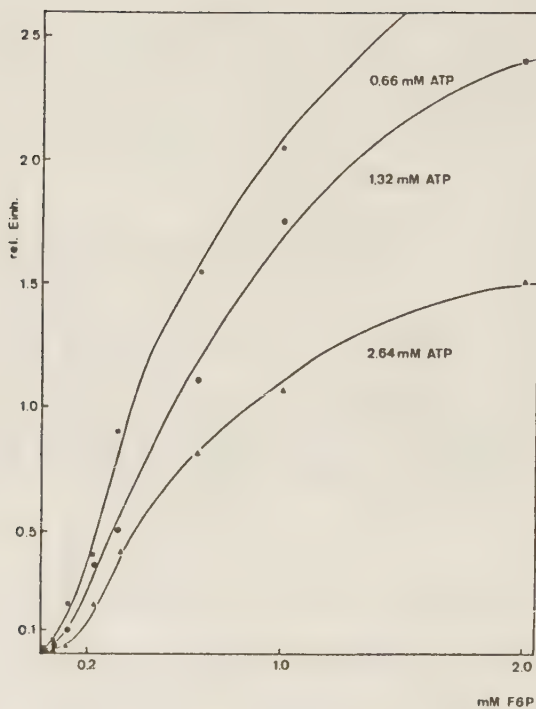


Abb. 30. Einfluß konstanter bereits hemmender ATP Konzentrationen auf die Reaktionsgeschwindigkeit der *Dunaliella* PFK bei variabler F-6-P Konzentration. Eine relative Einheit entspricht $0.81 \mu\text{M}$ F-1.6-P/min. Die Messung erfolgte mit dem Standardtestansatz.

nicht linear sondern exponentiell zu.

Die proteinchemische Deutung dieses Verhaltens ist mit Hilfe allosterischer Modellvorstellungen möglich (MONOD et al. 1965 und KOSHLAND et al. 1966). Die Voraussetzung der Anwendbarkeit dieser Modelle ist durch den oligomeren Charakter der Dunaliella PFK gegeben. Welchem der beiden Modelle hier jedoch der Vorrang zu geben ist, kann aufgrund der vorliegenden Untersuchungen nicht entschieden werden.

Bei variabler ATP Konzentration ergab sich eine hyperbolische Substratumsatzkurve, die im Bereich hoher ATP Konzentrationen eine deutliche Hemmung zeigt (Abb. 31). ATP wirkt also in hohen Konzentrationen als negativer Effektor auf die Dunaliella PFK.

Wie diese Ergebnisse weiter zeigen, beeinflusst das Verhältnis der Substratkonzentrationen das kinetische Verhalten des Enzyms. Form und Verlauf der F-6-P Substratumsatzkurve ist abhängig von der gewählten ATP Konzentration, die Hemmung durch ATP ist abhängig von der gewählten F-6-P Konzentration.

Die sigmoide Substratumsatzkurve der Dunaliella PFK in Abhängigkeit variabler F-6-P Konzentrationen ist nicht unbedingt Ausdruck einer durch ATP bedingten Hemmung. PFK aus *E. coli* (BLANGY et al. 1968) und *C. pasteurianum* (UYEDA und KUROOKA 1970). zeigt eine sigmoide Substratumsatzkurve gegenüber F-6-P, obwohl in beiden Fällen keine Hemmung durch ATP nachweisbar ist. Daß dieses Verhalten allgemeiner zu werten ist, beweist die ebenfalls sigmoide Substratumsatzkurve von Hefe PFK unter Verwendung nichthemmender Phosphatdonatoren (KOPPERSCHLÄGER et al 1968).

Bei den hier dargestellten Messungen ist zu berücksichtigen, daß der Testansatz aufgrund der Enzympräparation Ammoniumionen enthielt. Wie ABRAHAMS und YOUNATHAN (1971) nachgewiesen haben, handelt es sich bei Ammoniumionen um positive Effektoren. Ohne Ammoniumionen könnte die Kooperativität stärker sein, was im Zusammenhang dieser Arbeit nicht näher untersucht worden ist.

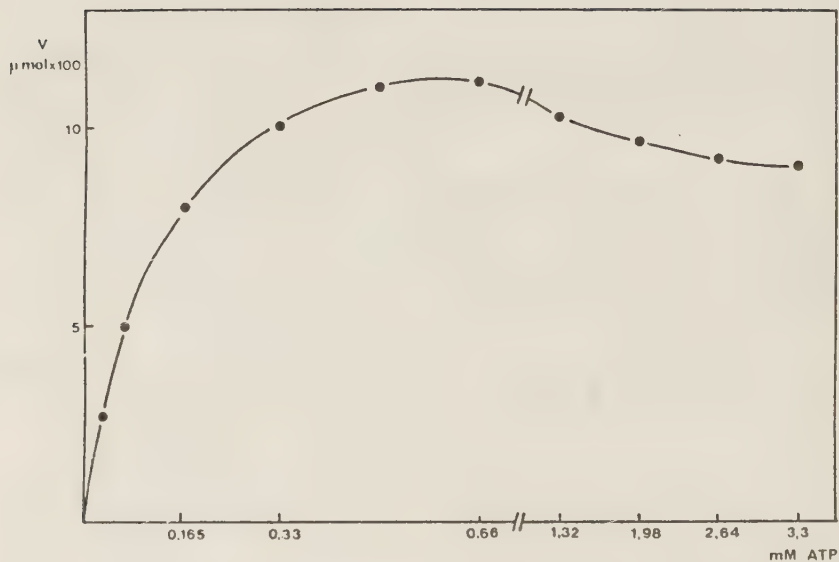


Abb. 31. Kinetik der *Dunaliella* PFK gegenüber ATP Konzentrationen über dem Sättigungsbereich. Die Messung erfolgte mit dem Standardtestansatz.

DISKUSSION

Die vorliegenden Untersuchungen der Dunaliella salina PFK haben gezeigt, daß dieses Enzym ein oligomeres Protein mit einem Molekulargewicht von 320.000 ist, das aus vier identischen Unter-einheiten (Protomere) je 80.000 Dalton , aufgebaut ist. Molekulare Daten pflanzlicher PFK Präparationen liegen bisher nur für Hefe (LINDELL und STELLWAGEN 1968, LIEBE et al. 1972) vor, aus denen sich ein hexameres Molekül mit einem Molekulargewicht von 584.000 ± 20.000 ergibt. Untersuchungen an Mais, Karotten, Kohl und Erbsen sind an teilweise gereinigten Extrakten durchgeführt worden (GARRARD und HUMPHREYS 1968, DENNIS und COULTATE 1966, 1967, KELLY und TURNER 1970) und lassen sich mit den hier vorliegenden Präparationen nicht vergleichen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit stimmen mit tierischen PFK Präparationen überein. AARONSON und FRIEDEN (1972) geben für Kaninchenmuskel PFK ein Molekulargewicht von 360.000 Dalton an; BRAND und SÖLING (1974) bestimmten für Rattenleber PFK ein Molekulargewicht von 320.000.

Wie die quantitative Auswertung des Elutionsprofils der Dunaliella PFK nach Agarose Gelchromatographie zeigt (Abb. 3a), liegen 58 % des Enzyms als inaktives Molekül vor (M_{II}). 36 % erscheinen als Aggregat im Ausschlußvolumen (M_I), 6 % als Dimeres (M_{III}). Die Lage des Aktivitätsmaximums ist in allen Experimenten unabhängig von der Proteinkonzentration. Vergleicht man dieses Elutionsprofil mit dem der Kaninchenmuskel PFK (Abb. 3b), so ergibt sich das gleiche Proteinverteilungsmuster.

Für das biologisch aktive Molekül geben PAETKAU und LARDY (1967) ein Molekulargewicht von 380.000 Dalton an, das dem Protein im Aktivitätsmaximum der Dunaliella PFK in Abb. 3a entspricht. Bei der Dunaliella und der Kaninchenmuskel PFK tritt jeweils ein Proteinmaximum mit einem Molekulargewicht von 320.000 Dalton auf.

Die elektrophoretische Analyse des Proteinmaximums M_{II} im Vergleich zum Aktivitätsmaximum hat eindeutig ergeben, daß es sich

um Proteine gleicher Mobilität handelt.

Das säulenchromatographische Verhalten der *Dunaliella* PFK zeigt, daß das tetramere PFK Molekül in zwei Konformationen stabil ist. Das Gleichgewicht liegt, wie die analytische Säulenchromatographie ergibt, auf der Seite der inaktiven d.h., der mehr kugelsymmetrischen Form. Der Übergang in die aktive Form ist mit einer Konformationsänderung und Zunahme der Asymmetrie des Moleküls verbunden.

Das säulenchromatographische Verhalten der *Dunaliella salina* PFK ist der erste direkte Hinweis für das Vorhandensein von zwei Konformationszuständen. Die in der Literatur beschriebenen Molekulargewichtsschwankungen von 320.000 - 380.000 Dalton für das biologisch aktive PFK Molekül sind aufgrund dieser Ergebnisse auf eine Konformationsänderung mit unterschiedlichem hydrodynamischen Verhalten zurückzuführen.

Unabhängig vom säulenchromatographischen Verhalten konnten diese Ergebnisse bei der Saccharosegradientenzentrifugation bestätigt werden. Das ebenfalls nicht deckungsgleiche Verhalten der *Dunaliella* PFK Aktivität und die Proteinverteilung entsprechen dem der Agarosegelchromatographie.

Aufgrund der Gradientenzentrifugation ergibt sich die Zuordnung der Sedimentationskonstanten für das Aktivitätsmaximum nach der analytischen Ultrazentrifugation. Dem tetrameren biologisch inaktiven PFK Molekül ist eine Sedimentationskonstante von 18S entsprechend einem S-Wert von 18.3 in der Saccharosegradientenzentrifugation zuzuordnen. Die Schwierigkeiten der Berechnung der Sedimentationskonstanten in einem Mehrkomponentensystem sind in den Ergebnissen dargestellt.

Die bei der *Dunaliella* PFK gemessenen Sedimentationskonstanten entsprechen den Daten der Kaninchenmuskel PFK. AARONSON und FRIEDEN (1972) geben für das Muskelenzym Sedimentationskonstanten von 12S, 18S und 28S an; LIEBE und Mitarbeiter (1972) bestimmten für das Hefeenzym eine Sedimentationskonstante von 17.85S, bei der Gradientenzentrifugation von 18.5S.

Messungen der Sedimentationskonstanten in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration führten bei hoch verdünnten Lösungen zu zwei Sedimentationsbanden von 12.5S und 18S. Die Berechnung der theoretischen Sedimentationskonstante ergab einen Wert von 12.4S, der mit den experimentellen Daten übereinstimmt. Für das tetramere Dunaliella PFK Molekül ergibt sich eine Sedimentationskonstante von 12.4S, die dem S-Wert der Kaninchenmuskel PFK von 12S entspricht (AARONSON und FRIEDEN 1972).

Das Auftreten von zwei Sedimentationsbanden selbst bei geringen Proteinkonzentrationen weist auf ein Mehrkomponentensystem bei der homogenen PFK hin, das in einem reversiblen Assoziations-Dissoziationsgleichgewicht steht (BETHUNE und GRILLO 1967)

Unter nativen Bedingungen ist als kleinste Untereinheit nur die dimere Form des Moleküls nachweisbar (200.000 Dalton Agarosegelchromatographie A 1.5m, 8.5S analytische Ultrazentrifugation). Es ist anzunehmen, das dieses Molekül die Grundeinheit der Aggregation darstellt (TELFORD et al. 1975); AARONSON und FRIEDEN (1972), die für das dimere Molekül eine Sedimentationskonstante von 7S angeben, sehen in dieser Form ebenfalls die Grundeinheit zur Aggregation.

Der Stokes'sche Radius der dimeren Dunaliella PFK von 40 Å erscheint im Vergleich zum tetrameren Molekül (54 Å) zu groß. Geht man bei der Aggregation der Dimeren von einer Reduktion des Asymmetrie aus, so ist die Größe der Radien erklärbar d.h., die Symmetrie des Moleküls muß zunehmen.

Aufgrund des Achsenverhältnisses von 1:8 für das hydratisierte tetramere Dunaliella PFK Molekül ergibt sich ein sphärisches Teilchen mit einheitlicher Elektronendichte wie die Berechnung des durchschnittlichen Streumassenradius gezeigt hat. Der Wert des aus dem Stokes'schen Radius berechneten Diffusionskoeffizienten von $3.4 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1}$ liegt an der Grenze eines sphärischen Teilchens und steht somit nicht im Widerspruch zum angegebenen Achsenverhältnis (TANFORD 1961).

Zwischen Streumassenradius und Diffusionskoeffizienten bei sphärischen Partikeln von einheitlicher Elektronendichte besteht die Beziehung

$$R_g = (3/5)^{1/2} \times F/6\pi\eta = (3/5)^{1/2} \times \frac{k \cdot T}{6\pi\eta D}$$

mit F als molarem Reibungskoeffizienten der translatorischen Bewegung und der Viskosität η des Lösungsmittels in Poise. Für den errechneten Diffusionskoeffizienten der Dunaliella PFK ergibt sich ein durchschnittlicher Streumassenradius (R_g) von 42 Å. Da aber aufgrund von Symmetrieoperationen mehrere Konformationszustände möglich sind, ist der errechnete Diffusionskoeffizient ein Mittelwert möglicher Konformer.

Da hexamere Formen bei der Dunaliella PFK nicht nachgewiesen werden konnten, ist wahrscheinlich, daß die weitere Aggregation des Moleküls über die tetrameren Formen erfolgt.

Wie die Produkthemmungsexperimente mit ADP und F-1.6-P gezeigt haben, liegt bei der Dunaliella PFK ein geordneter sequentieller Reaktionsmechanismus vor. Diese Daten entsprechen den Befunden von BRAND und SÖLING (1974), die für Rattenleber PFK ebenfalls einen geordneten sequentiellen Mechanismus angeben.

Ein zufälliger sequentieller Mechanismus wie er für die Kaninchenmuskel PFK von KEE und GRIFFIN (1972) und HANSON und Mitarbeiter (1973) angegeben wird, scheidet aus folgenden Überlegungen aus:

1. Eine kompetitive Hemmung von ADP gegenüber ATP kann aufgrund der vorliegenden Messungen eindeutig ausgeschlossen werden.
2. Weiter wurde gezeigt, daß die Hemmung von F-1.6-P gegenüber ATP bei gesättigter Konzentration von F-6-P nicht mehr nachweisbar ist.
3. Der Übergang der nichtkompetitiven Hemmung von ADP gegenüber F-6-P zu einer unkompetitiven Hemmung bei gesättigter ATP Konzentration ist nur bei einem geordneten sequentiellen Mechanismus möglich.

Die Interpretation von HANSON und Mitarbeiter (1973), die kompetitive Hemmung von F-1.6-P gegenüber F-6-P auf eine Konkurrenz des 1-Phosphats der Fruktose mit dem γ -Phosphat des ATP zurückzuführen, ist bei der Dunaliella PFK unwahrscheinlich, da die kompetitive Hemmung von F-1.6-P sowohl bei gesättigter als

auch ungesättigter Konzentration von ATP auftritt.

Der allosterische Charakter der Dunaliella PFK wurde durch Messen der Reaktionsgeschwindigkeit bei geringen F-6-P Konzentrationen in Gegenwart bereits hemmender ATP Konzentrationen sichtbar. Der sigmoide Kurvenverlauf deutet auf eine positive Kooperativität induziert durch das Substrat F-6-P hin.

Vergleicht man die proteinchemischen Daten der Dunaliella PFK mit dem allosterischen Verhalten, so ist die Erklärung der sigmoiden Substratumsatzkurve auf der Basis des Monod Modells möglich (MONOD et al. 1965). Bei Bestehen zweier Konformationszustände verschiebt die Bindung des Substrats F-6-P das Gleichgewicht zur aktiven Konformation. Im Bereich geringer Substratkonzentrationen tritt dann eine positive Kooperativität auf, bei der der Substratumsatz nicht linear sondern exponentiell zunimmt.

Die Hemmung der Dunaliella PFK bei hohen ATP Konzentrationen ist mit diesem Modell insofern vereinbar, da es sich hier nach dem Monod Modell um einen negativen heterotropen Effekt handeln könnte.

Die Untersuchung zur Austauschbarkeit der Nukleotidtriphosphate hat ergeben, daß die Purinderivate GTP und ITP als Phosphatdonatoren geeignet sind. Im Vergleich zum ATP ist die Hemmung durch diese Nukleotide bei hohen Konzentrationen weniger stark ausgeprägt. PFK Präparationen aus Kohl sind in ihrem Verhalten bezüglich der Nukleotidtriphosphate vergleichbar der Dunaliella PFK (DENNIS und COULTATE 1967). Für das Pyrimidinderivat UTP konnten Dennis und Coultate keine Wirksamkeit nachweisen. Im Gegensatz dazu zeigen die vorliegenden Experimente, daß UTP als Phosphatdonator besser geeignet ist als GTP. Zu vergleichbaren Ergebnissen kommen UYEDA und RACKER (1965) bei der Untersuchung an Kaninchenmuskel PFK.

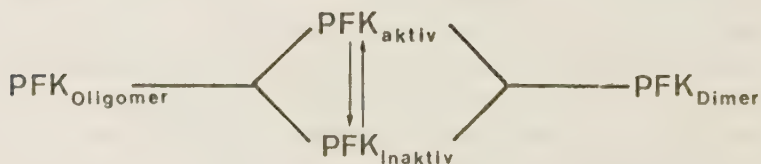
Effektoren wie Citrat und Phosphoenolpyruvat erwiesen sich als starke Inhibitoren der Dunaliella PFK. Bemerkenswert ist die relativ hohe Citratkonzentration (13 mM) im Vergleich zum Phosphoenolpyruvat (2 mM), die zu einer Hemmung der Dunaliella PFK führt. ATP in hohen Konzentrationen reduziert ebenfalls wie ADP

die Reaktionsgeschwindigkeit des Enzyms.

Eine Hypothese für die zelluläre Regulation der *Dunaliella* PFK aufgrund der Effektoren ist wie folgt denkbar: Phosphoenolpyruvat reguliert in einer Endprodukthemmung die Glykolyse über die PFK Aktivität. Zellorganellgebundenes Citrat tritt nicht in so hohen Konzentrationen im Cytoplasma auf wie für die Hemmung der PFK erforderlich ist. Wenn aus physiologischen Gründen Fette als Reservestoffe für die Energieversorgung der Zelle herangezogen werden, erreicht die Citratkonzentration Werte, die zur Hemmung der PFK Aktivität erforderlich sind.

Somit ergibt sich für den Organismus eine effektive Schaltstelle zwischen der Energiegewinnung aus kohlenhydrathaltigen und fetthaltigen Reservestoffen. Die Regulation der Glykolyse über F-1.6-P scheidet aufgrund der hohen K_I Werte für F-1.6-P aus.

Neben einer auf Effektormolekülen basierenden Steuerung der PFK Aktivität, ist die Regulation des Proteins auch über strukturell bedingte Faktoren möglich. Da die säulenchromatographische Analyse und das Verhalten in der analytischen Ultrazentrifuge eindeutig für ein Mehrkomponentensystem sprechen, ist die Regulation des Enzyms auch über Assoziations-Dissoziations Phänomene denkbar. Es konnte klar gezeigt werden, daß nur das tetramere Molekül biologisch aktiv ist, während höhere Aggregate und die dimere Form keine Enzymaktivität zeigen. Da die Dissoziation der *Dunaliella* PFK abhängig ist von der aktuellen Wasserstoffionenkonzentration, kann eine Regulation auf proteinchemischer Basis derart ablaufen, daß ein oligomeres System (höhere Aggregate der tetrameren Form) durch Verschiebungen in der Wasserstoffionenkonzentration aktiviert oder inaktiviert wird. Im Gleichgewicht unter physiologischen Bedingungen liegen



vor. Die Bindung der Substrate induziert die Umwandlung der inaktiven Vorstufe in die aktive Enzymform. Ein Absinken der Wasserstoffionenkonzentration unter pH 6.8, das zur Dissoziation des tetrameren PFK Moleküls führt, reduziert die Aktivität des Enzyms, bringt die Katalyse jedoch nicht zum Stillstand. Aufgrund des chemischen Gleichgewichts dissoziiert das oligomere Molekül in die tetramere Form, so daß Energiegewinnung auch unter extremen Bedingungen möglich ist. Die Frage, inwieweit im Assoziations-- Dissoziationsverhalten von Makromolekülen eine regulatorische Funktion zu sehen ist, bleibt Gegenstand weiterer Untersuchungen.

ZUSAMMENFASSUNG

Phosphofruktokinase (ATP-D-Fruktose-6-phosphat- 1-phosphotransferase, E.C. 2.7.1.11) wurde aus der zur Familie der Dunaliellaceae gehörenden Grünalge *Dunaliella salina* isoliert und bis zur Homogenität gereinigt.

Das Enzym ist ein oligomeres Protein mit einem Molekulargewicht von 320.000 Dalton. Vier Protomere mit einem Molekulargewicht von je 80.000 Dalton bilden das tetramere *Dunaliella* PFK Molekül.

Die dimere Form des Enzyms mit dem Stokes'schen Radius von $40 \text{ \AA}$ ist die Grundeinheit zur Aggregation. Der Übergang in die tetramere Form mit einem Stokes'schen Radius von $54 \text{ \AA}$ ist mit einer Zunahme der Symmetrie im Molekül verbunden.

Untersuchungen in der analytischen Ultrazentrifuge haben gezeigt, daß das reine Enzym ein Mehrkomponentensystem ist, das in einem reversiblen Gleichgewicht steht. Der Sedimentationskoeffizient des tetrameren Moleküls wurde zu 12.5S bestimmt.

Säulenchromatographische Untersuchungen führten zu dem Ergebnis, daß die *Dunaliella* PFK in zwei Konformationszuständen stabil ist, die sich in ihren hydrodynamischen Eigenschaften unterscheiden. Diese Daten werden im Zusammenhang mit dem allosterischen Verhalten des Enzyms auf der Basis des Monod Modellsystems oligomerer Proteine diskutiert.

Kinetische Untersuchungen führten zu der Ableitung eines geordneten sequentiellen Reaktionsmechanismus. Bei der *Dunaliella* PFK reagieren die Substrate mit dem Enzym in folgender Sequenz: Zuerst wird F-6-P und dann MgATP gebunden, MgADP ist das erste, F-1.6-P das zweite Reaktionsprodukt.

Der allosterische Charakter der *Dunaliella* PFK in bezug auf das Substrat F-6-P wurde bei bereits hemmenden ATP Konzentrationen nachgewiesen. Als Effektormoleküle, die die Reaktionsgeschwindigkeit der *Dunaliella* PFK beeinflussen, konnten Phosphoenolpyruvat und Citrat identifiziert werden.

Die Regulation der *Dunaliella* PFK aufgrund der Metabolite Phosphoenolpyruvat und Citrat wird im Hinblick auf die Ener-

giegewinnung aus kohlenhydrat- und fetthaltigen Reservestoffen diskutiert.

Ein Modell einer proteinchemischen Regulation aufgrund des Assoziations- Dissoziationsverhaltens der Dunaliella PFK wird vorgeschlagen.

ABKÜRZUNGEN

AMP	Adenosinmonophosphat
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adosintriphosphat
C.	Clostridium
CTP	Cytidintriphosphat
E.	Escherichia
F-1.6-P	Fruktose-1.6-biphosphat
ITP	Inosintriphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
Na ₂ -EDTA	Äthylendiamintetraacetat-diNatriumsalz
NAD ⁺	oxidiertes Nikotinamid-adenin-dinukleotid
NADH ₂	reduziertes Nikotinamid-adenin-dinukleotid
PEP	Phosphoenolpyruvat
PFK	Phosphofruktokinase
SDS	Sodiumdodecylsulfat
UTP	Uridintriphosphat

LITERATURVERZEICHNIS

- Aaronson, R.P. and Frieden, C. (1972): Rabbit muscle phosphofructokinase: Studies on the polymerization. J. Biol. Chem. 247, 7502-7509.
- Abrahams, S.L. and Younathan, E.S. (1971): Modulation of the kinetic properties of phosphofructokinase by ammonium ions. J. Biol. Chem. 246, 2464-2467.
- Ackers, G.K. (1970): Analytical gel chromatography of proteins. In: Adv. Protein Chem. 24. Anfinsen, C.B., Edsall, J.T. and Richards, F.M. (eds.) pp. 343-443 New York, London: Acad. Press
- Alberty, R.A. (1953): The relationship between Michaelis constants maximum velocities and the equilibrium constant for an enzyme catalyzed reaction. J. Amer. Chem. Soc. 75, 1928-1932.
- Atkinson, D.E. and Walton, G.M. (1965): Kinetics of regulatory enzymes. Escherichia coli phosphofructokinase. J. Biol. Chem. 240, 757-763.
- Atkinson, D.E., Hathaway, J.A., and Smith, E.C. (1965): Kinetics of regulatory enzymes: Effectors for yeast phosphofructokinase do not alter the apparent kinetic order of the reaction. Biochem. Biophys. Res. Commun. 18, 1-5.
- Bar-Tana, J. and Cleland, W.W. (1974): Rabbit muscle phosphofructokinase. I. Anomeric specificity; initial velocity kinetics. J. Biol. Chem. 249, 1263-1270.
- Baumann, P. and Wright, B.E. (1968): The phosphofructokinase of Dictyostelium discoideum. Biochemistry 7, 3653-3661.
- Beier, W. (1965): Einführung in die theoretische Biophysik. Stuttgart: Gustav Fischer Verl., S. 87-88.
- Bethune, J.L. and Grillo, P.J. (1967): The effect of intermediates upon the transport properties of polymerizing systems. I. Monomer, Trimer, and Nonamer. Biochemistry 6, 796-800.
- Blangy, D. (1968): Phosphofructokinase from E. coli. Evidence for a tetrameric structure of the enzyme. FEBS-Letters 2, 109-111.

- Blangy, D., Buc, H., Monod, J. (1968): Kinetics of the allosteric interaction of phosphofructokinase from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 31, 13-35.
- Brand, I.A. and Söling, H.D. (1974): Rat liver phosphofructokinase. Purification and characterization of its reaction mechanism. *J. Biol. Chem.* 249, 7824-7831.
- Brock, D.J.H. (1969): Purification and properties of sheep liver phosphofructokinase. *Biochem. J. (UK)* 113, 235-242.
- Chance, B. (1943): The kinetics of the enzyme-substrate compound of peroxydase. *J. Biol. Chem.* 151, 553-577.
- Cleland, W.W. (1963): The kinetics of enzyme catalyzed reactions with two or more substrates or products. III. Prediction of initial velocity and inhibition patterns by inspection. *Biochim. Biophys. Acta.* 67, 188-196.
- Cori, C.F. (1942): In: A Symposium on Respiratory Enzymes, p. 173. Madison: Univ. of Wisconsin Press.
- Dennis, D.T., Coultate, T.P. (1966): Phosphofructokinase, a regulatory enzyme in plants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 25, 187-191.
- Dennis, D.T. and Coultate, T.P. (1967): The regulatory properties of a plant phosphofructokinase during leaf development. *Biochim. Biophys. Acta* 146, 129-137.
- Dische, Z. (1935): Die Bedeutung der Phosphorsäureester für den Ablauf und die Steuerung der Blutglykolyse. *Biochem. Z.* 280, 248-264.
- Dixon, M. and Webb, E.C. (1958): *Enzymes*. London, New York, Toronto: Longmans Green.
- Elias, H.G. (1969): *Ultrazentrifugen-Methoden*. 3. Aufl. München: Beckman Instruments, 57-66.
- Engelhardt, V.A. and Sakov, N.E. (1943): The mechanism of the Pasteur-effect. *Biokhimiya* 8, 9-36.
- Fosmire, G.J. and Timasheff, S.N. (1972): Molecular weight of beef heart lactate dehydrogenase. *Biochemistry* 11, 2455-2460.
- Fott, B. (1971): *Algenkunde*. Stuttgart: Gustav Fischer Verl., 281-283.
- Frieden, C. (1971): Protein-protein interaction and enzymatic activity. *Ann. Rev. Biochem.* 40, 653-696.

- Fujita, H. (1962): Mathematical theory of sedimentation analysis. New York and London: Acad. Press, p. 221.
- Garland, P.B., Randle, P.I., and Newsholme, E.A. (1963): Citrat as an intermediary in the inhibition of phosphofructokinase in rat heart muscle by fatty acids, ketone bodies, pyruvat, diabetis, and starvation. Nature (Lond.) 200, 169-170.
- Garrard, L.A. and Humphreys, T.E. (1968): Aerobis fermentation and phosphofructokinase in tissue slices of the corn scutellum. Phytochemistry 7, 1949-1961.
- Gerhardt, B.P. and Beevers, H. (1968): Influence of sucrose on protein determination by the Lowry procedure. Anal. Biochem. 24, 337-339.
- Gutfreund, H. (1972): Enzymes: Physical Principles. London: Wiley, pp. 143-146.
- Hamburger, C. (1905): Zur Kenntnis der Dunaliella salina und einer Amöbe aus Salinenwasser von Cagliari. Arch. für Protistenkunde 6, 111-130.
- Hanson, R.L., Rudolph, F.B., and Lardy, H.A. (1973): Rabbit muscle phosphofructokinase. The kinetic mechanism of action and the equilibrium constant. J. Biol. Chem. 248, 7852-7859.
- Hedrick, J.L. and Smith, A.J. (1968): Size and charge isomer separation and estimation of molecular weights of proteins by disc gel electrophoresis. Arch. Biochem. Biophys. 126, 155-164.
- Hofmann, E. (1976): The significance of phosphofructokinase to the regulation of carbohydrate metabolism. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 75.
- Hulme, E.C. and Tipton, K.F. (1971): The isotope-exchange reactions of ox heart phosphofructokinase. Biochem. J. (U.K.) 122, 181-187.
- Kee, A. and Griffin, C. (1972): Kinetic studies of rabbit muscle phosphofructokinase. Arch. Biochem. Biophys. 149, 361-368.
- Kelly, G.J. and Turner, J.F. (1968): Inhibition of pea-seed phosphofructokinase by phosphoenolpyruvate. Biochem. Biophys. Res. Commun. 30, 195-199.

- Kelly, G.J. and Turner, J.F. (1970): The regulation of pea seed phosphofructokinase by 6-phosphogluconate, 3-phosphoglycerate, 2-phosphoglycerate and phosphoenolpyruvate. *Biochim. Biophys. Acta* 208, 360-367.
- Kemp, R.G. and Krebs, E.G. (1967): Binding of metabolites by phosphofructokinase. *Biochemistry* 6, 423-434.
- Kemp, R.G. (1969): Allosteric properties of muscle phosphofructokinase. I. Binding of magnesium adenosine triphosphate to the inhibitory site. *Biochemistry* 8, 3162-3168.
- Kemp, R.G. (1971): Rabbit liver phosphofructokinase. Comparison of some properties with those of muscle phosphofructokinase. *J. Biol. Chem.* 246, 245-252.
- Kopperschläger, G., Freyer, R., Diezel, W., and Hofmann, E. (1968): Some kinetic and molecular properties of yeast phosphofructokinase. *FEBS-Letters* 1, 137-141.
- Kopperschläger, G., Lorenz, I., Diezel, W., Marquardt, J., und Hofmann, E. (1972): Hefe Phosphofructokinase: Hydrodynamische Eigenschaften, Substruktur, Aminosäurezusammensetzung und Reaktivität der SH-Gruppen. *Acta biol. med. germ.* 29, 561-580.
- Koshland, D.E., Némethy, G., and Filmer, D. (1966): Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits. *Biochem. J. (U.K.)* 5, 365-385.
- Koshland, D.E. and Neet, K.E. (1968): The catalytic and regulatory properties of enzymes. *Ann. Rev. of Biochem.* 37, 359-410.
- Krzanowski, J. and Matschinsky, F.M. (1969): Regulation of phosphofructokinase by phosphocreatine and phosphorylated glycolytic intermediates. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 34, 816-823.
- Laurent, T.C. and Killander, J. (1964): A theory of gel filtration and its experimental verification. *J. Chromatog.* 14, 317-330.
- Layzer, R.B., Rowland, L.P., and Ranney, H.M. (1967): Muscle phosphofructokinase deficiency. *Arch. Neurol. (Chic.)* 17, 512-513.

- Layzer, R.B., Rowland, L.P., and Bank, W.J. (1969): Physical and kinetic properties of human phosphofructokinase from skeletal muscle and erythrocytes. *J. Biol. Chem.* 244, 3823-3831.
- Layzer, R.B. and Conway, M.M. (1970): Multiple isoenzymes of human phosphofructokinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 40, 1259-1265.
- Leonard, K.R. and Walker, J.A. (1972): The self-association of rabbit-muscle phosphofructokinase. *Eur. J. Biochem.* 26, 442-448.
- Lerche, W. (1937): Untersuchungen über Entwicklung und Fortpflanzung in der Gattung *Dunaliella*. *Arch. für Protistenkunde* 88, 236-268.
- Liebe, St., Diezel, W., Kopperschläger, G. und Hofmann, E. (1972): Hefe-Phosphofructokinase: Substrat-und Effektorwirkungen auf das Assoziations- und Dissoziationsverhalten. *Acta biol. med. germ.* 28, 39-50.
- Lindell, T.J. and Stellwagen, E. (1968): Purification and properties of phosphofructokinase from yeast. *J. Biol. Chem.* 243, 907-912.
- Lineweaver, H. and Burk, D. (1934): The determination of enzyme dissociation constants. *J. Amer. Chem. Soc.* 56, 658-666.
- Ling, K.H., Marcus, F., and Lardy, H.A. (1965): Purification and some properties of rabbit skeletal muscle phosphofructokinase. *J. Biol. Chem.* 240, 1893-1899.
- Lorenson, M.Y. and Mansour, T.E. (1969): Studies on heart phosphofructokinase. Binding properties of native enzyme and of enzyme desensitized to allosteric control. *J. Biol. Chem.* 244, 6420-6431.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Lowry, O.H., Passonneau, J.V., Hasselberger, F.X., and Schulz, D.W. (1964): Effect of Ischemia on known substrates and cofactors of the glycolytic pathway in brain. *J. Biol. Chem.* 239, 18-30.

- Lynen, F., Hartmann, G., Netter, K.F., and Schuegraf, A. (1959): Phosphate turnover and Pasteur effect. In: Ciba Foundation Symposium on the Regulation of Cell Metabolism. Wolstenholme, G.E.W. and O'Connor, C.M. (eds.) London: Churchill, pp. 256-273.
- Mansour, T.E. (1965): Studies on heart phosphofructokinase: Active and inactive forms of the enzyme. J. Biol. Chem. 240, 2165-2172.
- Mansour, T.E., Wakid, N., and Sprouse, H.M. (1966): Studies on heart phosphofructokinase. Purification, crystallization, and properties of sheep heart phosphofructokinase. J. Biol. Chem. 241, 1512-1521.
- Mansour, T.E. and Ahlfors, C.E. (1968): Studies on heart phosphofructokinase. Some kinetic and physical properties of the crystalline enzyme. J. Biol. Chem. 243, 2523-2533.
- Martin, R.G. and Ames, B.N. (1961): A method for determining the sedimentation behavior of enzymes: application to protein mixtures. J. Biol. Chem. 236, 1372-1379.
- McLachlan, J. (1960): The culture of *Dunaliella tertiolecta*. Butcher - a euryhaline organism. Can. J. Microbiol. 6, 367-379.
- McEwen, C.R. (1967): Tables for estimating sedimentation through linear concentration gradient of sucrose solution. Analyticae Biochemistry 26, 111-119.
- Mildvan, A.S. (1974): Mechanism of enzyme action. Ann. Rev. of Biochem. 43, 357-399.
- Monod, J., Wyman, J., and Changeux, J.-P. (1965): On the nature of allosteric transitions: A plausible model. J. Mol. Biol. 12, 88-118.
- Muntz, J.A. (1953): Partial purification and some properties of brain phosphofructokinase. Arch. Biochem. Biophys. 42, 435-445.
- Newsholme, E.A. and Randle, P.J. (1964): Regulation of glucose uptake by muscle. 7. Effects of fatty acids; ketone bodies and pyruvate, and of alloxan-diabetes, starvation, hypophysectomy and adrenalectomy, on the concentrations of hexose phosphates, nucleotids and inorganic phosphate in perfused rat heart. Biochem. J. (U.K.) 93, 641-651.

- Newsholme, E.A., Sugden, P.H., and Opie, L.H. (1970): The apparent inhibition of phosphofructokinase by reduced nicotinamide-adenine dinucleotide: a problem of coupled enzyme assays. *Biochem. J. (U.K.)* 119, 787-789.
- Ornstein, L. and Davis, B.J. (1964): Disc-Electrophoresis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 121, 321-349.
- Paetkau, V.H. and Lardy, H.A. (1967): Phosphofructokinase. Correlation of physical and enzymatic properties. *J. Biol. Chem.* 242, 2035-2042.
- Paetkau, V.H., Younathan, E.S., and Lardy, H.A. (1968): Phosphofructokinase: Studies on the subunit structure. *J. Mol. Biol.* 33, 721-736.
- Paradies, H.H. and Vettermann, W. (1976): On the quaternary structure of native rabbit muscle phosphofructokinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71, 520-526.
- Parmeggiani, A., Luft, J.H., Love, D.S., and Krebs, E.G. (1966): Crystallization and properties of rabbit muscle phosphofructokinase. *J. Biol. Chem.* 241, 4625-4637.
- Passonneau, J.V. and Lowry, O.H. (1962): Phosphofructokinase and the Pasteur effect. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 7, 10-15.
- Perrin, F. (1935): Mouvement brownien d'un ellipsoïde. II. Rotation libre et dépolarisation des fluorescences. Translation et diffusion de molécules ellipsoïdales. *J. Phys.* 7, 1-11.
- Racker, E. (1947): Spectrophotometric measurement of hexokinase and phosphohexokinase activity. *J. Biol. Chem.* 167, 843-854.
- Reisler, E. and Eisenberg, H. (1969): Interpretation of equilibrium sedimentation measurements of proteins in guanidine hydrochloride solutions. Partial volumes, density increments, and the molecular weight of the subunits of rabbit muscle aldolase. *Biochemistry* 8, 4572-4578.
- Salas, M.L., Vinuela, E., Salas, M., and Sols, A. (1965): Citrate inhibition of phosphofructokinase and the Pasteur effect. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 19, 371-375.

- Setlow, B. and Mansour, T.E. (1970): Studies on heart phosphofructokinase. Nature of the enzyme desensitized to allosteric control by photo-oxydation and by acylation with ethoxycarbonyl anhydride. *J. Biol. Chem.* 245, 5524-5533.
- Sober, H.A., Hartley, R.W., Carroll, W.R., and Peterson, E.A. (1965): Fractionation of proteins. In: *The Proteins*. Vol. 3. New York and London: Acad. Press, Chapt. 12, pp. 31-34.
- Tanford, Ch. (1961): *Physical Chemistry of Macromolecules*. New York: Wiley, pp. 407-411.
- Tanford, Ch., Kawahara, K., and Lapanje, S. (1967): Proteins as random coils. I. Intrinsic viscosities and sedimentation coefficients in concentrated guanidine hydrochloride. *J. Amer. Chem. Soc.* 89, 729-736.
- Tarui, S., Okuno, G., Ikura, Y., Tanaka, T., Suda, M., Nishikawa, M. (1965): Phosphofructokinase deficiency in skeletal muscle. A new type of glycogenosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 19, 517-523.
- Tarui, S., Kono, N., Nasch, T., and Nishikawa, M. (1969): Enzymatic basis for the coexistence of myopathy and hemolytic disease in inherited muscle phosphofructokinase deficiency. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 34, 77-83.
- Tarui, S., Kono, N., and Uyeda, K. (1972): Purification and properties of rabbit erythrocyte phosphofructokinase. *J. Biol. Chem.* 247, 1138-1145.
- Telford, J.N., Lad, P.M., and Hammes, G.G. (1975): Electron microscope study of native and crosslinked rabbit muscle phosphofructokinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 3054-3056.
- Teodoresco, E.C. (1905): Organisation et développement du *Dunaliella*, nouveau genre de Volvocacée-Polyblépharidée. *Bot. Zentralblatt, Beih.* 18, 215-232.
- Teodoresco, E.C. (1906 a): Observations morphologiques et biologiques sur le genre *Dunaliella*. *Rev. Gén. de Botanique* 18, 353-371.
- Teodoresco, E.C. (1906 b): Observations morphologiques et biologiques sur le genre *Dunaliella* (Fin). *Rev. Gén. de Botanique* 18, 409-428.

- Uyeda, K. and Racker, E. (1965): Regulatory mechanisms in carbohydrate metabolism. VII. Hexokinase and phosphofructokinase. *J. Biol. Chem.* 240, 4682-4688.
- Uyeda, K. (1970): Studies on the reaction mechanism of skeletal muscle phosphofructokinase. *J. Biol. Chem.* 245, 2268 - 2275.
- Uyeda, K. and Kurooka, S. (1970): Crystallization and properties of phosphofructokinase from *Clostridium Pasteurianum*. *J. Biol. Chem.* 245, 3315-3324.
- Uyeda, K. (1972): Studies on the fructose 1-phosphate kinase activity of rabbit muscle phosphofructokinase. *J. Biol. Chem.* 247, 1692-1698.
- Vinuella, E., Salas, M.L., and Sols, A. (1963): End-product inhibition of yeast phosphofructokinase by ATP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 22, 140-145.
- Wakid, N. and Mansour, T.E. (1965): Factors influencing the stability of heart phosphofructokinase. *Mol. Pharmacol.* 1, 53-59.
- Warburg, O. und Christian, W. (1941): Isolierung und Kristallisation des Gärungsferments Enolase. *Biochem. Z.* 310, 384-421.
- Weber, K. and Osborn, M. (1969): The reliability of molecular weight determination by dodecyl-sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244, 4406-4412.
- Wenzel, K.W., Zimmermann, G., Gauer, J., Diezel, W., Liebe, St., and Hofmann, E. (1972): Evidence for different oligomeric forms of human erythrocyte phosphofructokinase. *FEBS-Letters* 19, 285-289.
- Werz, G. und Kellner, G. (1970): Die Struktur des Golgi-Apparates bei gefrier-geätzten *Dunaliella*-Zellen. *Protoplasma* 69, 351-364.
- Wong, J.T.F. (1975): Kinetics of Enzyme Mechanisms. New York: Acad. Press, pp. 48-49.
- Yoshida, M. (1972): Allosteric nature of thermostable phosphofructokinase from an extreme thermophilic bacterium. *Biochemistry* 11, 1087-1093.
- Yphantis, D.A. (1964): Equilibrium ultracentrifugation of dilute solutions. *Biochemistry* 3, 297-317.

LEBENS LAUF

- 26.8.1945 geboren in Herne/Westfalen als Sohn des Feinmechanikers Werner Vettermann und seiner Ehefrau Antonia Vettermann, geb. Repse
- 1946 Wohnungswechsel meiner Eltern nach Berlin
- 1952 Einschulung in die 8./9. Grundschule in Berlin
- 1958 Wechsel zur Ranke-Oberschule in Berlin
- 1967 Abitur an der Lily-Braun-Oberschule in Berlin und Immatrikulation an der Freien Universität Bérln für das Studienfach Botanik
- 1969 Diplomvorprüfung in Biologie an der Freien Universität Berlin
- 1971 mündliche Diplomprüfung für das Fach Biologie an der Freien Universität Berlin
- 1971/72 Erstellung der Diplomarbeit am Institut für Pflanzenphysiologie und Zellbiologie unter Anleitung von Herrn Prof. Werz
- 1973 wissenschaftliche Assistentenstelle am Institut für Pflanzenphysiologie und Zellbiologie und Beginn der Doktorarbeit unter Anleitung von Herrn Prof. Paradies

